Circulardichroismus offenkettiger und cyclischer Cystinpeptide

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard—Karls—Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Ottnad

aus Rottweil

1975

1974

75 61

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0005

Circulardichroismus offenkettiger und cyclischer Cystinpeptide

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard—Karls—Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Ottnad
aus Rottweil

1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1974

Dekan:	Prof. Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Rau

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Günther Jung in der Zeit vom April 1972 bis Mai 1974 am Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Ich danke meinem Lehrer sehr herzlich für sein ständiges Interesse an meiner Arbeit und für zahlreiche wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer danke ich für die Überlassung von Institutseinrichtungen.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für ein Graduierten-Stipendium.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1. Elektronenanregungsspektren	4
2.1.1. Die Disulfidgruppe	4
2.1.2. Die Carbonylgruppe in Amiden, Estern und Urethanen	7
2.1.3. Die Carboxylgruppe in Aminosäuren und Peptiden	8
2.1.4. Der Aromat in L-Phenylalanin und L-Tyrosin	9
2.2. Schwingungsspektren	10
2.2.1. Infrarot-Spektren	10
2.2.2. Raman-Spektren	11
3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE UND DISKUSSION	15
3.1. S-Alkylthio-L-cysteine	15
3.1.1. Abhängigkeit des Circulardichroismus der S-Alkylthio-L-cysteine vom Alkylrest	15
3.1.2. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine	20
3.1.3. pH-Abhängigkeit der CD-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine	24
3.1.4. IR- und Raman-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine	24
3.2. L-Glutathion	28
3.2.1. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von G-SS-G	31
3.2.2. Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Spektren von oxidiertem L-Glutathion	33
3.2.3. Lösungsmittelabhängigkeit der CD-Spektren von oxidiertem L-Glutathion	37
3.2.4. Raman-Spektren von oxidiertem L-Glutathion	42

3.3. Cyclo-L-cystin 44
3.3.1. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von Cyclo-L-cystin 45
3.3.2. Lösungsmittelabhängigkeit der CD-Spektren von Cyclo-L-cystin 48
3.3.3. Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Spektren von Cyclo-L-cystin 50
3.3.4. IR- und Raman-Spektren von Cyclo-L-cystin 54
3.3.5. Cyclo-L-cystin-Derivate 56
3.3.5.1. CD-Spektren von L-Cysteinyl-cystein-disulfid-hydrochlorid 1, L-Cysteinyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid 2 und tert.-Butyloxycarbonyl-L-cysteinyl-cystein-disulfid-methylester 3 56
3.3.5.2. IR- und Raman-Spektren von 1, 2 und 3 62

3.4. Tripeptide mit Disulfidbrücken 64
3.4.1. Boc-L-cysteinyl-alanyl-cystein-disulfid-methylester 1 64
3.4.1.1. Lösungsmittelabhängigkeit der CD-Spektren von 1 66
3.4.1.2. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von 1 69
3.4.2. Tripeptide der Struktur Boc-Cys-(X)-Cys-OMe 72
3.4.2.1. CD-Spektren der Verbindungen 1 bis 6 72
3.4.2.2. IR-Spektren der Verbindungen 1 bis 6 77
3.4.3. Tripeptide der Struktur Cys-(X)-Cys-OMe x HCOOH 77
3.4.3.1. CD-Spektren der Tripeptide mit abgespaltenem tert.-Butyloxycarbonylrest 79
3.4.3.2. Vergleich der Tripeptide 1 bis 6 mit den Tripeptiden 1a bis 6a 82

3.5. Verbindungen des Typs Boc-Cys-$(Gly)_x$-Cys-OMe 84
3.5.1. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von Boc-Cys-Gly-Cys-OMe 1 87

3.5.2. Zeitabhängigkeit des CD-Spektrums von 1 87
3.5.3. Verbindungen des Typs
Boc-Cys-(Gly)$_x$-Cys-OMe
mit x = 2, 3, 4, 5 91
3.5.4. L-Cysteinyl-pentaglycyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid 5a und L-Cysteinyl-heptaglycyl-cystein-disulfid 6 94

3.6. Vasotocine und Vasopressine 96
3.6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Literatur 97
3.6.2. CD-Spektren von Derivaten des Lysinvasotocins und Lysinvasopressins 98

4. ZUSAMMENFASSUNG 104

5. ANHANG 108

5.1. Durchführung der Messungen 108
5.2. Verbindungen 109

6. LITERATURVERZEICHNIS 111

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Disulfidgruppe des Cystins ist ein wesentliches Element der Stabilität für die Konformation vieler Proteine. In vielen Fällen besitzt sie auch eine spezifische biologische Funktion, z.B. bei Redoxprozessen oder beim Disulfidaustausch. Zu den wichtigsten und am besten untersuchten in der Natur vorkommenden Disulfiden gehören die L-α-Liponsäure [1], das Tripeptid L-Glutathion [2,3], die Epidithiadiketopiperazine Gliotoxin [4], Aranotin [5,6], Sporidesmin [7,8], Chaetocin [9] und ähnliche Antibiotika, die Peptidhormone Oxytocin [10] und Vasopressin [11] sowie deren Analoge und das Insulin [12,13]. Zu den Polypeptiden mit Disulfidbrücken zählen viele Enzyme, wie z.B. Lysozym [14], und Proteine, wie Serumalbumin [15].

Messungen des Circulardichroismus (CD) und der Optischen Rotationsdispersion (ORD) von L-Cystin, von Analogen des L-Cystins und von L-Cystin enthaltenden Peptiden haben gezeigt, daß diese chiroptischen Methoden besonders geeignet sind, die Konformation und die Änderungen der Konformation der Disulfidbrücken zu untersuchen. Es ist jedoch bisher nicht möglich gewesen, in allen Fällen die Beziehung zwischen der Stereochemie und dem Circulardichroismus der Disulfide zu verstehen. Die bisher durchgeführten CD-Untersuchungen haben sich nämlich vorwiegend mit starren cyclischen Disulfiden befaßt [16-27]. Untersuchungen an nicht-cyclischen Disulfiden, die vor allem an L-Cystin und seinen Derivaten durchgeführt worden sind [20,28-37], haben gezeigt, daß hier die Aussagen aus den CD-Spektren wegen der Flexibilität der Reste an der Disulfidgruppe und wegen der Rotation um die CSSC-Gruppierung noch unklar sind.

Die elektronische Struktur der Disulfidgruppe ermöglicht nämlich die Bildung energiegleicher Enantiomerer mit P-(plus)- bzw. M-(minus)-Helizität [38], sofern die sta-

bilste Form diejenige ist, bei der die Anordnung der betreffenden Atome nicht koplanar ist. Die Anwesenheit weiterer Chiralitätszentren führt dann zur Bildung von Diastereomeren, die z.B. die Konfiguration R am chiralen Zentrum und P- bzw. M-helikale Disulfidbrücken besitzen; dieser Fall liegt z.B. bei L-Cystin vor. Wegen des geringen thermodynamischen Stabilitätsunterschieds dieser Diastereomeren [39] und der relativ niedrigen Rotationsbarrieren um die Disulfidgruppe [40-43] liegt in Lösung ein Gemisch der möglichen Diastereomeren vor. Die Verteilung der Diastereomeren sollte von der Temperatur abhängig sein, worauf die starke Temperaturabhängigkeit des Drehwerts [44] sowie des Circulardichroismus von L-Cystin [30] und von N,N'-Diacetyl-L-cystinbismethylamid [33] hinweisen. Selbst im festen Zustand findet sich nur eine geringe Bevorzugung eines der möglichen Diastereomeren vor dem anderen; z.B. besitzen zwei Disulfidgruppen des Lysozyms P-Helizität und die zwei übrigen M-Helizität [14].

In dieser Arbeit soll versucht werden, die Konformation und die Konformationsänderungen der Disulfidgruppe in L-Cystin-derivaten und L-Cystin haltigen Peptiden mit Hilfe des Circulardichroismus zu untersuchen. Um den Einfluß von der Disulfidgruppe benachbarten Resten auf den Circulardichroismus zu ermitteln, werden die S-Alkylthio-L-cysteine herangezogen (3.1.). Die Temperaturabhängigkeit des Circulardichroismus offenkettiger Disulfide wird am Beispiel des oxidierten L-Glutathions ausführlich untersucht (3.2.). An Cyclo-L-cystin und seinen Derivaten soll untersucht werden, ob auch in relativ starren Molekülen eine Diastereomerenumwandlung eintreten kann (3.3.). Der Einfluß des Disulfidchromophors auf den Circulardichroismus von Peptiden wird an einer Reihe von Tripeptiden (3.4.), zum Teil in Abhängigkeit von der Temperatur und vom Lösungsmittel untersucht. Der schrittweise Einbau einer steigenden Anzahl von Glycinresten zwischen C- und N-terminales L-Cystein

soll Aussagen darüber ermöglichen, ab welcher Kettenlänge ein Peptiddisulfid analog zu L-Cystin behandelt werden kann (3.5.). Zuletzt werden einige Analoge des Vasotocins und Vasopressins (3.6.) untersucht. Um die aus den CD-Spektren erhaltenen Aussagen zu unterstützen und zu ergänzen, werden in einigen Fällen die ^{13}C-NMR-Spektren und die Laser-Raman-Spektren herangezogen.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Elektronenanregungsspektren

Die Interpretation der Elektronenanregungsspektren (UV und CD) der untersuchten Verbindungen erfordert die Kenntnis der Termschemata dieser Moleküle. Die im Bereich von 350 nm bis 190 nm auftretenden Absorptionsbanden haben ihren Ursprung in der Anregung von Elektronen aus den chromophoren Gruppen: der Disulfidgruppe, der Carbonylgruppe der Amid-, Ester- bzw. Urethanbindung, der Carboxylgruppe und der Aromaten. In den von L-Cystin abgeleiteten Disulfiden tritt keine Konjugation der Chromophore auf; es genügt also, das Termschema der isolierten Chromophore zur Beschreibung der Elektronenübergänge.

2.1.1. Die Disulfidgruppe

Das Absorptionsverhalten von Disulfiden kann durch ein einfaches Modell beschrieben werden [45,46]. Man betrachtet die Wechselwirkung der 3p-Orbitale der beiden Schwefelatome, die nicht zur S-S- bzw. C-S-Bindung beitragen, sondern mit den beiden freien Elektronenpaaren besetzt sind. Wie man der Abb. 1 [47] entnehmen kann, führt diese

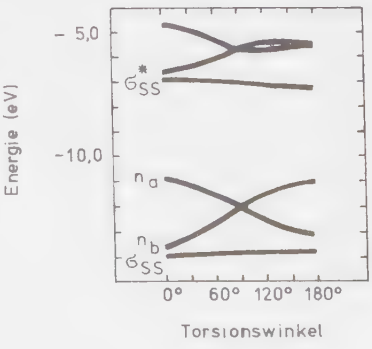


Abb. 1: Abhängigkeit der drei höchsten besetzten und der drei niedrigsten unbesetzten MOs vom Torsionswinkel ϕ

Wechselwirkung zu zwei Orbitalen, deren Energie stark von einer Änderung des Torsionswinkels ϕ der CSSC-Gruppierung betroffen wird. Bei einem Torsionswinkel von 0° bzw. 180° ist die Aufspaltung der beiden Orbitale am größten, entsprechend einer starken Wechselwirkung, bei etwa 90° sind sie entartet. Anschaulich könnte man auch sagen, daß sich die freien Elektronenpaare bei $\phi = 0^\circ$ oder $\phi = 180^\circ$ am stärksten abstoßen, während bei $\phi = 90^\circ$ die Abstoßung am geringsten ist [48]. UV-Photoelektronenspektren von Disulfiden belegen die Gültigkeit dieses Modells [49,50].

Die längstwellige Absorption im UV-Bereich kommt nun durch Anregung eines Elektrons aus diesen Orbitalen in das niedrigste unbesetzte Orbital, ein σ^*_{SS}-Orbital, zustande. Die Energie dieses Orbitals ist nur wenig vom Torsionswinkel abhängig (siehe Abb. 1). Daraus ergibt sich die starke Abhängigkeit der längstwelligen Disulfidabsorptionsbande vom Torsionswinkel, die schon 1954 beobachtet wurde [51]. Aus theoretischen Berechnungen an H_2S_2 ergibt sich, daß einer Veränderung von ϕ um 1° eine Wellenlängenverschiebung um 1,67 nm entspricht [52]. Bei $\phi = 90^\circ$ liegt die längstwellige Absorptionsbande von Dimethyldisulfid bei ungefähr 250 nm [53]. Rechnungen ergeben für die nahezu entarteten Übergänge Absorptionsmaxima bei 247 nm und 245 nm [47]. Bei größeren oder kleineren Torsionswinkeln beobachtet man zwei Absorptionsbanden, die symmetrisch zu 250 nm liegen [18,20].

Verschiedene weitere theoretische Untersuchungen an Disulfiden [54-56] stimmen zumindest in der Zuordnung des längstwelligen Übergangs überein, auch wenn sie sich in der Zuordnung von Übergängen höherer Energie widersprechen. Alle Autoren sind sich auch über den Ursprung der breiten langwelligen Absorptionsbande von Disulfiden mit Torsionswinkeln um 90° einig, die sie auf die Entartung der beiden Übergänge $n_a - \sigma^*$ und $n_b - \sigma^*$ zurückführen.

Mit Hilfe dieses MO-Modells läßt sich auch die optische Aktivität der Disulfide erklären. Die beiden Übergänge $n_a - \sigma^*$ und $n_b - \sigma^*$ besitzen nämlich die entgegengesetzte Symmetrie in Bezug auf die C_2-Achse der Disulfidgruppe. In Übereinstimmung mit der allgemeinen Theorie, die aus der Symmetrie des Übergangs und der Helizität des Chromophors das Vorzeichen des entsprechenden Cotton-Effekts vorauszusagen erlaubt [57], wurde die sogenannte "Quadrantenregel" entwickelt [58] (Abb. 2). Ihre Gültigkeit wurde durch zahlreiche Untersuchungen an Disulfiden mit Torsionswinkeln $\phi \approx 60^\circ$ [16-18], sowie für $\phi = 90^\circ$ [22] und $\phi = 120^\circ$ [21] bewiesen.

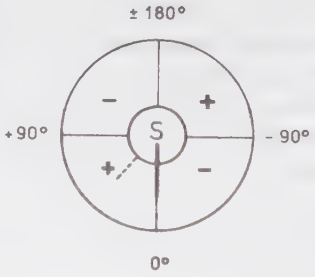


Abb. 2: "Quadrantenregel" für den Disulfidchromophor

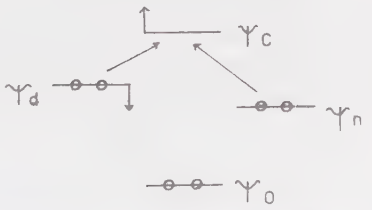
Bei Molekülen mit Torsionswinkeln um 90° folgt aus der Theorie, daß sich die den beiden entarteten Übergängen entsprechenden Cotton-Effekte, die entgegengesetzte Vorzeichen ihrer Rotationsstärken besitzen, aufheben sollten. Die dennoch zu beobachtende restliche optische Aktivität im langwelligen Bereich kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: Einerseits tritt bei Torsionswinkeln um 90° noch keine vollständige Aufhebung der Cotton-Effekte auf, und die restliche optische Aktivität wird von der Helizität der Disulfidgruppe bestimmt. Andererseits "induzieren" der Disulfidgruppe benachbarte Reste mit chiralem Zentrum die optische Aktivität des Disulfidübergangs. Es ist dabei nicht ohne weiteres möglich, diese intrinsischen bzw. extrinsischen Effekte getrennt zu erfassen.

Der Ursprung der Cotton-Effekte höherer Energie ist widersprüchlich. Für Dimethyldisulfid mit $\phi = 90^{\circ}$ durchgeführte Rechnungen setzen den torsionswinkelunabhängigen $\sigma - \sigma^*$-Übergang bei 181 nm an [47]. Der Cotton-Effekt von L-Cystin bei 190 nm [30] wird ebenfalls dem $\sigma - \sigma^*$-Übergang zugeschrieben. Auch die in Disulfiden mit $\phi = 90^{\circ}$ auftretenden Cotton-Effekte bei etwa 200 nm sollen auf torsionswinkelunabhängigen Disulfidübergängen beruhen [19,22,36,37].

2.1.2. Die Carbonylgruppe in Amiden, Estern und Urethanen

Die längstwellige Absorptionsbande der Carbonylgruppe in Amiden, Estern und Urethanen ist einem $n - \pi^*$-Übergang zuzuschreiben. Dieser $n - \pi^*$-Übergang liegt gewöhnlich im Bereich von 210 nm bis 220 nm [59]. Er zeigt, eine ausgeprägte Lösungsmittelabhängigkeit. Die starke hypsochrome Verschiebung dieses Übergangs gegenüber gesättigten Aldehyden und Ketonen ist leicht zu erklären: Durch Wechselwirkung des unbesetzten π-Orbitals der Carbonylgruppe mit einem besetzten Orbital der OR- bzw. NR_2-Gruppierung mit π-Symmetrie wird das π^*-Orbital angehoben, während das besetzte Orbital stabilisiert wird (Abb. 3) [60,61].

Abb. 3: $n - \pi^*$-Übergang eines durch die NR_2-Gruppe gestörten Carbonyls



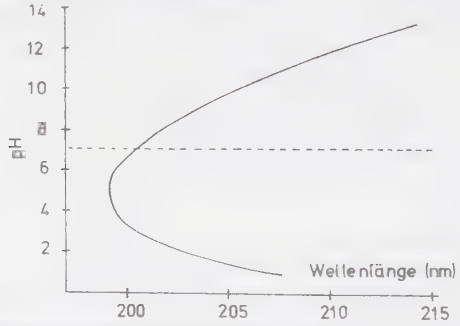
Beim Übergang von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln tritt eine hypsochrome Verschiebung auf, da der Grundzustand durch Wechselwirkung des Lösungsmittels mit dem freien Elektronenpaar der Carbonylgruppe stärker stabi-

lisiert wird als der angeregte Zustand. Eine weitere Absorption bei höherer Energie beruht auf einem $\pi - \pi^*$-Übergang [62]. Dieser Übergang ist im UV-Spektrum sehr intensiv. Auch der mit diesem Übergang verbundene Cotton-Effekt tritt sehr stark auf, wobei im allgemeinen die Rotationsstärke des $\pi - \pi^*$-Übergangs größer ist als die des $n - \pi^*$-Übergangs.

2.1.3. Die Carboxylgruppe in Aminosäuren und Peptiden

Aufgrund des Gleichgewichts zwischen den protonierten und nicht-protonierten Formen der Aminosäuren sind sowohl Lage als auch Rotationsstärke der Carbonylbande im Bereich von 200 nm bis 210 nm stark pH-abhängig [63]. Wie eigene Untersuchungen zeigen, verschiebt sich das Absorptionsmaximum des asymmetrisch gestörten $n - \pi^*$-Übergangs der Carboxylbande bei pH-Änderungen in der in Abb. 4 gezeigten Weise [64]. Im zwitterionischen Bereich wird die CD-Bande nach kurzen Wellenlängen verschoben, wobei im allgemeinen auch eine Abnahme der Elliptizität des Cotton-Effekts beobachtet wird.

Abb. 4: pH-Abhängigkeit des Carboxyl-Cotton-Effekts



Diese hypsochrome Verschiebung bei der Dissoziation des Protons der Carboxylgruppe kann durch die Destabilisierung des π^*-Orbitals interpretiert werden [65]. Diese

begleitet die Stabilisierung des π-Orbitals der Carboxylatgruppe gegenüber dem π-Orbital der Carboxylgruppe. Die Dissoziation des Protons von der Aminogruppe hat eine Verschiebung nach längeren Wellen zur Folge. Offensichtlich ist also beim Carboxylchromophor der Abstand zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand im Zwitterion größer als im Anion oder Kation.

Eine Sektorregel, die Vorzeichen und Amplitude des Carboxyl-Cotton-Effekts mit der absoluten Konfiguration und Konformation der Aminosäuren in Beziehung setzt [66], wurde durch Anwendung der bekannten Oktantenregel [67] auf diese Verbindungsklasse formuliert. Diese Regel wird durch den Befund, daß alle L-α-Aminosäuren in saurer wäßriger Lösung einen positiven Carboxyl-Cotton-Effekt besitzen, bestätigt.

2.1.4. Der Aromat in L-Phenylalanin und L-Tyrosin

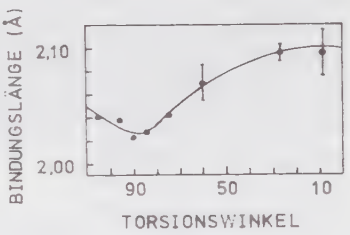
Bei L-Phenylalanin wie bei L-Tyrosin resultiert die optische Aktivität im langwelligen Bereich aus einem $\pi - \pi^*$-Übergang des aromatischen Rings, der durch das C_α der Aminosäure asymmetrisch gestört wird. Während bei den isolierten aromatischen Aminosäuren der schwache längstwellige Cotton-Effekt stets positiv ist [28], findet man in Peptiden, die diese Aminosäuren enthalten, sowohl positive als auch negative Cotton-Effekte in diesem Bereich. Dies ist durch die verschiedene Orientierung der störenden Gruppen relativ zum Übergangsmoment des langwelligen $\pi - \pi^*$-Übergangs zu erklären. Charakteristisch für L-Phenylalanin enthaltende Peptide ist die Feinstruktur der längstwelligen Bande; diese kann auch bei der isolierten Aminosäure beobachtet werden, nicht aber bei L-Tyrosin. Die Übergänge bzw. Cotton-Effekte bei höherer Energie fallen in Bereiche, wo auch die Amid- bzw. Carboxylgruppen absorbieren. In diesem Bereich ist es sehr schwierig, die Beiträge der

einzelnen Chromophore zur optischen Aktivität getrennt zu ermitteln.

2.2. Schwingungsspektren

Es ist bekannt, daß auch die Bindungslänge der SS-Bindung von Disulfiden vom Torsionswinkel abhängt (Abb. 5). Man beobachtet ein ausgeprägtes Minimum der Bindungslänge bei $\phi = 90^{\circ}$ [68].

Abb. 5: Abhängigkeit der Bindungslänge vom Torsionswinkel ϕ



Dies ist aufgrund der elektronischen Verhältnisse an der Disulfidgruppe leicht zu verstehen, da bei Torsionswinkeln um 90° die Abstoßung der freien Elektronenpaare minimal wird, während sie bei Abweichungen von 90° rasch größer wird. Eine Verlängerung der SS-Bindung bedeutet aber eine Verringerung der Kraftkonstanten der SS-Schwingung und damit eine Verringerung ihrer Frequenz. Man sollte also eine deutliche Abhängigkeit der SS-Schwingungsfrequenz vom Torsionswinkel erwarten, sofern diese Schwingung nicht mit anderen koppelt.

2.2.1. Infrarot-Spektren

Damit eine Schwingung IR-aktiv ist, muß sich bei dieser Schwingung das Dipolmoment des Moleküls bzw. der schwingenden Gruppe ändern. Dies ist im allgemeinen nur bei Vorliegen einer polaren Bindung möglich. Es ist also zu erwarten, daß weder die CS- noch die SS-Streck-

schwingungen im IR-Spektrum auftreten, da die Elektronegativitätsdifferenz zwischen Kohlenstoff und Schwefel sehr klein und die SS-Bindung völlig unpolar ist. Übereinstimmend damit findet man in den IR-Spektren der Disulfide im Bereich der SS-Schwingung um 500 cm^{-1} nur sehr schwache Banden, während die CS-Schwingungen bei etwa 650 cm^{-1} etwas stärker auftreten [69-71]. Die Zuordnung dieser Banden in den hier untersuchten Molekülen ist nicht möglich, da in beiden Bereichen mehrere schwache Banden auftreten, die Schwingungen anderer Gruppen oder Molekülfragmente entsprechen.

2.2.2. Raman-Spektren

Die Raman-Spektroskopie ist im Gegensatz zur IR-Spektroskopie zur Untersuchung der Disulfide ideal geeignet, da sowohl die CS- als auch die SS-Schwingungen mit einer starken Veränderung der Polarisierbarkeit verbunden und somit Raman-aktiv sind. Dazu kommt, daß diese Schwingungsbanden in einen Frequenzbereich fallen, wo nur wenige intensive Banden anderer Gruppen zu erwarten sind [72-74]. So sind selbst bei so komplexen biologischen Molekülen wie Lysozym [75-77], Ribonuklease [78], Insulin [79-81] und anderen Enzymen die CS- und SS-Schwingungsfrequenzen klar aus den Raman-Spektren erhalten worden. Abb. 6 zeigt deutlich die Überlegenheit des Raman-Spektrums im Vergleich mit dem IR-Spektrum bei der Zuordnung der CS- und SS-Schwingungen von S-Octylthio-L-cystein.

Seitdem durch die Einführung des Lasers als Lichtquelle die Raman-Spektrometrie wesentlich empfindlicher geworden ist, hat man sich auch mit Untersuchungen über den Zusammenhang der Schwingungsfrequenzen der CS- und SS-Schwingungen mit dem Torsionswinkel sowie den C-S-S-Winkeln befaßt. Dabei ist man zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen gekommen:

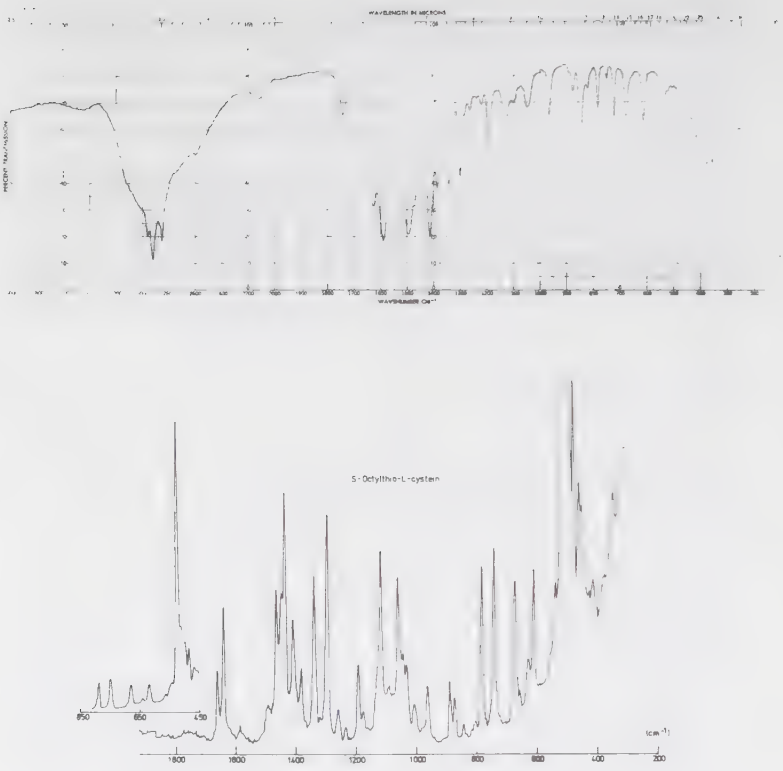
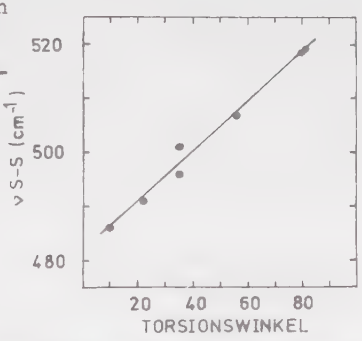


Abb. 6: IR- und Raman-Spektren von festem S-Octylthio-L-cystein

1. Nach Untersuchungen an einfachen Dialkyldisulfiden, an L-Cystin und L-Cystin-derivaten sowie an D,L-6,8-Thioctsäure, teils als Festkörper, teils in wäßriger Lösung, soll kein direkter Zusammenhang zwischen dem Torsionswinkel der Disulfidgruppe und der SS-Streckschwingung bestehen [76]. Dagegen soll das Intensitätsverhältnis der CS-Schwingung zur SS-Schwingung Rückschlüsse auf die C-S-S-Winkel zulassen. So soll ein geringes Intensitätsverhätnis einem C-S-S-Winkel von ungefähr 115°, ein Verhältnis in der Größenordnung von 2,0 bis 3,0 einem Winkel von etwa 105° entsprechen. Obwohl diese Regeln auch auf Proteine mit Disulfidbrücken übertragen worden sind, scheinen sie doch nur in einer begrenzten Anzahl von Fällen zuzutreffen.

2. Andere haben für eine Reihe von Disulfiden mit ähnlichen CC-SS-Winkeln eine lineare Beziehung zwischen Torsionswinkel der Disulfidgruppe und Wellenzahl der SS-Schwingung gefunden (Abb. 7) [82].

Abb. 7: Beziehung zwischen der SS-Streckfrequenz und dem Torsionswinkel der Disulfidgruppe



Das Auftreten mehrerer Banden im Bereich der SS- und der CS-Schwingung wird auf Konformere zurückgeführt, die zwar denselben Torsionswinkel der CS-SC-Gruppierung, aber verschiedene Winkel der CC-SS-Gruppierung besitzen.

3. Eine weitere Untersuchung an ähnlichen Verbindungen wie oben ergibt, daß keine Beziehung zwischen Torsions-

winkel und SS-Schwingungsfrequenz besteht [83]. Dagegen werden auch hier die CC-SS-Torsionswinkel für das Auftreten mehrerer Banden im Bereich der SS- und der CS-Schwingungen verantwortlich gemacht. Eine ausführliche Untersuchung an Dialkyldisulfiden kommt zu dem Schluß [71], daß die Disulfidschwingungsfrequenz von 540 cm^{-1} auf 510 cm^{-1} abnehmen kann, je nachdem, ob sich in der Anordnung X-CS-SC-Y Wasserstoff oder Kohlenstoff an den zum entfernteren Schwefelatom jeweils trans-ständigen Positionen X bzw. Y befinden.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Intensitäten der einzelnen Banden im Festkörper und in Lösung verschieden sein können. Eine im Festkörperspektrum stark auftretende Bande muß aber auch im Lösungsspektrum stark sein, wenn sie der SS-Schwingung zugeordnet werden soll. Leider war bisher die Aufnahme der Raman-Spektren vieler Disulfide in Lösung nicht möglich, so daß keine definitive Zuordnung getroffen werden konnte, wenn mehrere Banden im Bereich der SS-Schwingungsfrequenz auftraten.

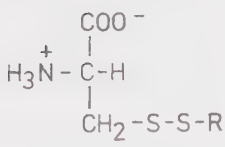
3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE, AUSWERTUNG UND DISKUSSION

3.1. S-Alkylthio-L-cysteine

Bereits bei L-Cystin lassen sich sterische, elektronische und elektrostatische Effekte auf den Disulfidchromophor nicht differenziert untersuchen. Deshalb wurde ein Cysteinylrest durch Alkylthio-gruppen ersetzt. Die Abhängigkeit des Circulardichroismus dieser S-Alkylthio-L-cysteine vom Alkylrest und von der Temperatur [39] soll hier diskutiert werden. Die pH-Abhängigkeit der CD-Spektren von S-Methylthio-L-cystein wurde schon früher untersucht [36,39] und soll hier nur kurz referiert werden.

3.1.1. Abhängigkeit des Circulardichroismus der S-Alkylthio-L-cysteine vom Alkylrest

Die CD-Spektren von S-Methyl- (1), S-Äthyl- (2), S-Propyl- (3), S-Butyl- (6), S-Octyl- (7), S-neo-Pentyl- (8), S-Benzyl- (9), S-Tolyl- (10), S-iso-Propyl- (4), S-sek.-Butyl- (11), S-Cyclohexyl- (12), S-tert.-Butyl- (5) und S-tert.-Pentyl-thio-L-cystein (13) wurden im Bereich von 350 nm bis 190 nm gemessen (Abb. 8). Als Lösungsmittel diente 1 N HCl, außer bei (7) und (10), wo wegen der geringen Löslichkeit in 1 N HCl ein Gemisch von Iso-Propanol und 1 N HCl (2:3, v/v) verwendet wurde.



R = CH_3 (1), C_2H_5 (2), C_3H_7 (3), C_4H_9 (6), C_8H_{17} (7), $(CH_3)_3C\text{-}CH_2$ (8), $(CH_3)_2CH$ (4), $(CH_3)(C_2H_5)CH$ (11), C_6H_{11} (12), $(CH_3)_3C$ (5), $C_6H_5\text{-}CH_2$ (9), $(CH_3)_2(C_2H_5)C$ (13), $CH_3\text{-}C_6H_4$ (10),

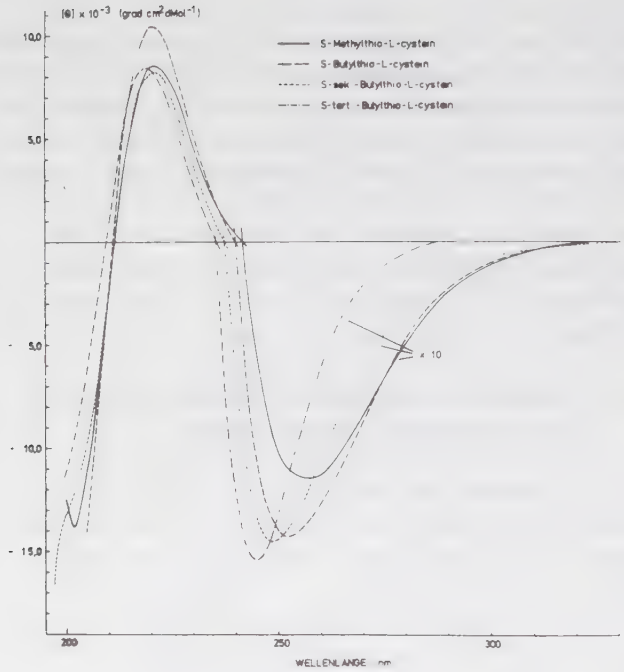


Abb. 8: CD-Spektren von (1), (6), (11) und (5) in 1 N HCl bei 25° C

In der Reihe der S-Alkylthio-L-cysteine äußert sich der Substitutionsgrad der Alkylgruppe in einer ausgeprägten regelmäßigen hypsochromen Verschiebung der Maxima des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts in der Reihenfolge CH_3 < primäre < sekundäre < tertiäre Alkylgruppe. Dies stimmt mit UV-Untersuchungen an symmetrischen und asymmetrischen Dialkyldisulfiden und -diseleniden überein [84], bei denen die Verschiebung auf Hyperkonjugation beruhen könnte [85]. Zwischen der Lage der UV-Absorptionsbanden der symmetrischen Disulfide und den CD-Maxima der S-Alkylthio-L-cysteine besteht eine einfache Beziehung: Die Maxima der Cotton-Effekte liegen bei einer Wellenlänge, die der Mitte zwischen dem UV-Maximum von Diäthyldisulfid (für den Cysteinteil) und dem des entsprechenden symmetrischen Dialkyldisulfids (für den S-Alkylthio-teil) entspricht. So findet man z.B. das Maximum des Cotton-Effekts bei (4) (248 nm) in der Mitte zwischen den UV-Maxima von Diäthyldisulfid (251,5 nm) und Diisopropyldisulfid (245 nm). Ausnahmen bilden (1) und die tertiären S-Alkylthio-L-cysteine, deren Cotton-Effekte wesentlich längerwellig liegen, als man aus obiger Beziehung erwarten würde. Im Falle der tertiären Verbindungen ist dies darauf zurückzuführen, daß in Ditert.-butyldisulfid eine starke sterische Behinderung der Methylgruppen an der Disulfidbrücke auftritt, die beim gemischten primär-tertiären Disulfid aufgehoben ist. Diese sterische Wechselwirkung verursacht bei Ditert.-butyldisulfid eine Aufweitung des Torsionswinkels der CS-SC-Gruppe von etwa 90° auf circa 110° [50].

Dagegen läßt sich keine eindeutige Abhängigkeit der molaren Elliptizitäten bzw. Rotationsstärken des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts von der Art des Alkylsubstituenten feststellen (Tab. 1). Bei allen S-Alkylthio-L-cysteinen, bis auf (1), beobachtet man Elliptizitäten im Bereich von - 1300 grad cm^2 $dMol^{-1}$ bis 1500 grad cm^2 $dMol^{-1}$. Bei L-Cystin beträgt die molare

Tab. 1: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte der S-Alkylthio-L-cysteine bei 25° C in 1 N HCl

Verbindung	λ (nm)	$[\theta]$ (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
S-Methylthio-L-cystein (1)	257	- 1130
	221	8620
S-Äthylthio-L-cystein (2)	252,5	- 1440
	221	8260
S-Propylthio-L-cystein (3)	253	- 1300
	221	7830
S-iso-Propylthio-L-cystein (4)	248	- 1520
	220	8220
S-tert.-Butylthio-L-cystein (5)	244,5	- 1560
	218,5	8560
S-Butylthio-L-cystein (6)	251,5	- 1450
	221	10600
S-Octylthio-L-cystein (7)	252,5	- 1520
	221,5	8670
S-neo-Pentylthio-L-cystein (8)	252,5	- 1310
	221	8390
S-Benzylthio-L-cystein (9)	273	- 550
	250	- 930
	223	4630
S-Tolylthio-L-cystein (10)	282,5	- 4130
	238	- 29350
	218,5	5390
S-sek.-Butylthio-L-cystein (11)	248	- 1450
	221	8260
S-Cyclohexylthio-L-cystein (12)	250	- 1430
	221	8220
S-tert.-Pentylthio-L-cystein (13)	247	- 1370
	220	9400

Elliptizität unter vergleichbaren Bedingungen 1800 grad cm^2 $dMol^{-1}$ [28]. Obwohl sich also in L-Cystin zwei Chiralitätszentren in der Nachbarschaft der Disulfidgruppe befinden, ist die Elliptizität nur wenig größer als in den S-Alkylthio-L-cysteinen. Der Nachbargruppenbeitrag zur optischen Aktivität von Disulfiden mit Torsionswinkeln um 90^o scheint also nur gering zu sein.

Für den positiven Carboxyl-Cotton-Effekt findet man weder für die Lage noch für seine Elliptizität eine Abhängigkeit von der Art der Alkylgruppe an der Disulfidbrücke. Dies bestätigt, daß die Orientierung der SS-Gruppe relativ zur Carboxylgruppe in allen S-Alkylthio-L-cysteinen gleich ist. In L-Cystin tritt bei 220 nm der Carboxylübergang nur mit doppelt so hoher Intensität auf, was das Fehlen spezifischer intramolekularer Wechselwirkungen nahelegt. Intramolekulare Wechselwirkungen, z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, führen nämlich gewöhnlich durch Stabilisierung einer definierten Konformation zu größeren Elliptizitätswerten als man durch Summation der Elliptizitäten der einzelnen gleichartigen Chromophore errechnen würde. Bei fast allen S-Alkylthio-L-cysteinen tritt bei 200 nm oder etwas kürzerwellig ein weiterer stark negativer Cotton-Effekt auf, dessen Lage und Elliptizität ebenfalls nur wenig vom Alkylsubstituenten abhängen. Ähnlich starke Cotton-Effekte treten bei L-Cystin (196 nm) [28] und auch bei trans-2,3-Dithiadekalin (203 nm in n-Heptan) [16,19,20] auf, was auf ihre Beziehung zum Disulfidchromophor hinweist.

Die Deutung der UV- und CD-Spektren von S-Benzylthio-L-cystein (9) und S-Tolylthio-L-cystein (10) ist durch die Anwesenheit des aromatischen Chromophors erschwert. Während sich bei (9) das CD-Spektrum nur in den Elliptizitätswerten sowie durch die Andeutung eines langwelligen Minimums bei 273 nm von den Spektren der S-

Alkylthio-L-cysteine unterscheidet, dominiert im Spektrum von (10) der aromatische Ring mit seinen Übergängen [86]. Der Disulfidübergang wird sowohl im UV-Spektrum als auch im CD-Spektrum vollständig verdeckt, während der Carboxyl-Cotton-Effekt mit verminderter Intensität bei 218,5 nm auftritt; im UV-Spektrum ist dieser Übergang allerdings nicht aufzufinden, da er durch die Maxima bei 208 nm und 235 nm überdeckt wird (Abb.9).

Erstaunlich ist die im Vergleich zu den übrigen Aminosäuren langwellige Lage des Carboxyl-Cotton-Effekts. Da bei den Aminosäuren mit Thioäthergruppierung keine entsprechende bathochrome Verschiebung dieses Cotton-Effekts beobachtet wird [31,64,87], muß diese auf eine, wenn auch geringe Wechselwirkung zwischen der Disulfid- und der benachbarten Carboxylgruppe zurückzuführen sein. Möglicherweise führt auch der intensive negative Cotton-Effekt bei höherer Energie durch Überlappung mit dem Carboxyl-Cotton-Effekt zu einer scheinbaren bathochromen Verschiebung [33,88]. Ähnliche Effekte traten bei der Untersuchung der UV-Spektren von 4,5-Dithia-oktandicarbonsäure-1,8 auf, was auf eine Störung des $n \rightarrow \pi^*$-Übergangs der Carboxylgruppe durch die Disulfidgruppe zurückgeführt wird [84].

3.1.2. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine

Eine ausführliche Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von (1) bis (5) sowie (9) liegt vor [36,39]. Zusätzlich wurde das CD-Spektrum von (10) in einem Gemisch von Isopropanol und 1 N HCl (3:2, v/v) bei 25°, 50°, 75° C gemessen (Abb. 9). Alle S-Alkylthio-L-cysteine zeigen eine ähnlich ausgeprägte Temperaturabhängigkeit. Die Elliptizitäten des längstwelligen Cotton-Effekts bei etwa 250 nm und des kurzwelligen Cotton-Effekts bei etwa 200 nm zeigen eine drastische

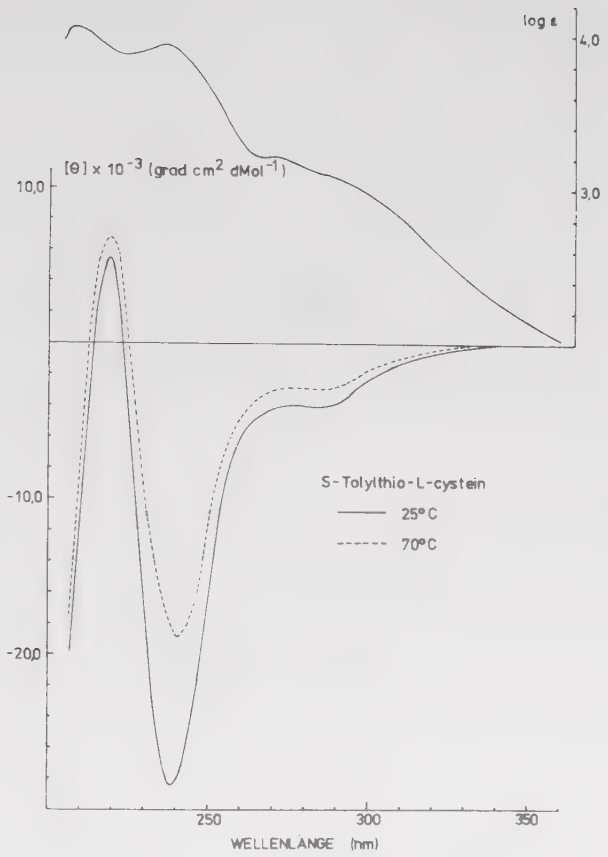


Abb. 9: UV- und CD-Spektren von S-Tolylthio-L-cystein in Isopropanol/1 N HCl (2:3, v/v)

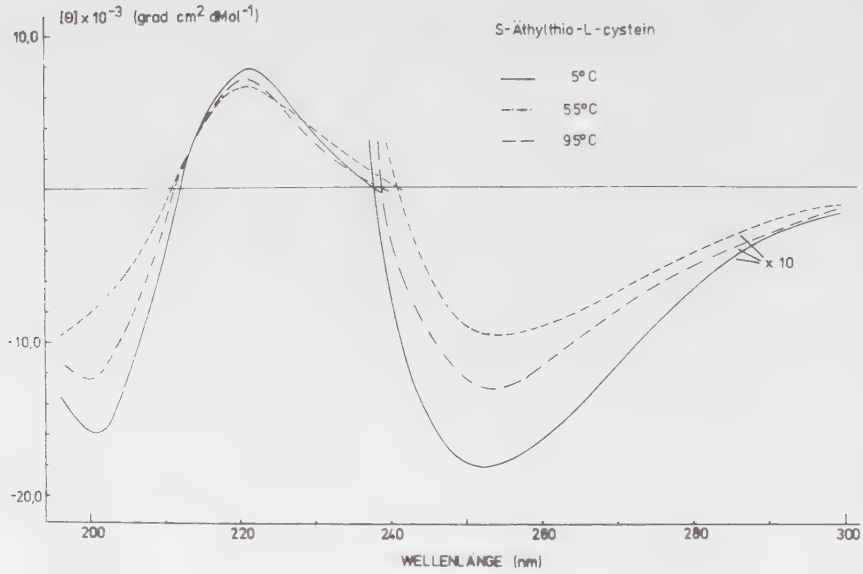


Abb. 1C: Temperaturabhängigkeit der Cotton-Effekte von S-Äthylthio-L-cystein in 1 N HCl

Abnahme bei Temperaturerhöhung, während die Elliptizität des Carboxyl-Cotton-Effekts bei 220 nm nur wenig abnimmt (Abb. 10). Dies entspricht dem normalen Kauzmann-Eyring-Effekt [89], der besagt, daß im allgemeinen durch Temperaturerhöhung der Betrag der Elliptizität abnimmt. Dies läßt sich durch eine zunehmende Gleichverteilung der Rotameren mit entgegengesetzten Beiträgen zur optischen Aktivität erklären. Dagegen sind die Abnahmen der Elliptizitäten der beiden negativen Cotton-Effekte zu groß, als daß sie nur durch den Kauzmann-Eyring-Effekt erklärt werden könnten. Die gleichartige Abnahme der Elliptizitäten legt nahe, daß bei beiden Cotton-Effekten derselbe Mechanismus die Abnahme bedingt. Derselbe Effekt tritt auch bei oxidiertem L-Glutathion auf und soll dort ausführlicher behandelt werden (3.2.1.).

Ebenso wie S-Benzylthio-L-cystein (9) [39] zeigt auch S-Tolylthio-L-cystein (10) ein von den übrigen Verbindungen abweichendes Verhalten (Abb. 9). Zwar nehmen bei (10) die Elliptizitäten der Cotton-Effekte bei 283 nm und 238 nm bei Temperaturerhöhung ebenfalls stark ab unter gleichzeitiger geringer Verschiebung nach längeren Wellenlängen, doch beobachtet man für den positiven Cotton-Effekt bei 218 nm eine Zunahme der Elliptizität. Die relativ starke Abnahme der Elliptizitäten der Aromaten-Cotton-Effekte zeigt, daß die Nachbarschaft der Disulfidgruppe zum Aromaten diesen wesentlich stärker beeinflußt als etwa die Nachbarschaft des C_α in L-Tyrosin; bei der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin wird nämlich keine entsprechende Abnahme der Elliptizitäten bei Temperaturerhöhung beobachtet [30]. Die Zunahme der Elliptizität des Carboxyl-Cotton-Effekts scheint darauf zurückgeführt werden zu können, daß mit zunehmender Temperatur eine solche Konformation des Moleküls stabilisiert wird, die einen positiven Cotton-Effekt der Carboxylgruppe hervorruft.

3.1.3. pH-Abhängigkeit der CD-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine

Eine pH-Änderung der Lösung beeinflußt die CD-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine erwartungsgemäß sehr stark. Aminosäuren mit Disulfidgruppen zeigen dasselbe Dissoziationsverhalten des Carboxylchromophors wie die übrigen Aminosäuren (Abb. 11). Von besonderem Interesse ist aber die Tatsache, daß auch der langwellige Disulfid-Cotton-Effekt stark pH-abhängig ist. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Disulfidgruppe trotz ihrer Entfernung von der COOH- bzw. NH_3^+-Gruppierung durch die Dissoziation beeinflußt wird. Dies kann zum einen auf elektrostatische Effekte, zum anderen darauf zurückgeführt werden, daß die Population der drei gestaffelten Rotameren bei den einzelnen dissoziierten Formen verschieden ist [90]. Offensichtlich bewirkt die Ammoniumgruppierung eine hypsochrome Verschiebung des Disulfid-Cotton-Effekts verglichen mit der neutralen Aminogruppe. Im Alkalischen kommt jedoch noch eine bathochrome Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums der Disulfidgruppe selbst hinzu. Ein solcher Effekt wird auch bei Zusatz von Alkali zu Lösungen von Dimethyldisulfid beobachtet [53].

3.1.4. IR- und Raman-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine

Die IR-Spektren wurden im Bereich von 350 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} in KBr aufgenommen. Erwartungsgemäß ergeben sich aus den IR-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine keine Aufschlüsse über die Konformation der Disulfidgruppe, obwohl im Bereich zwischen 500 cm^{-1} und 520 cm^{-1} bei manchen Verbindungen sehr schwache Banden vorhanden sind. Bei den hier untersuchten Verbindungen handelt es sich nicht um gut kristallisierte Festkörper. Es ist daher möglich und wahrscheinlich, daß bei diesen Festkörpern mehrere Rotamere auftreten können, während im idealen Kristall nur ein bevorzugtes Rotameres auftre-

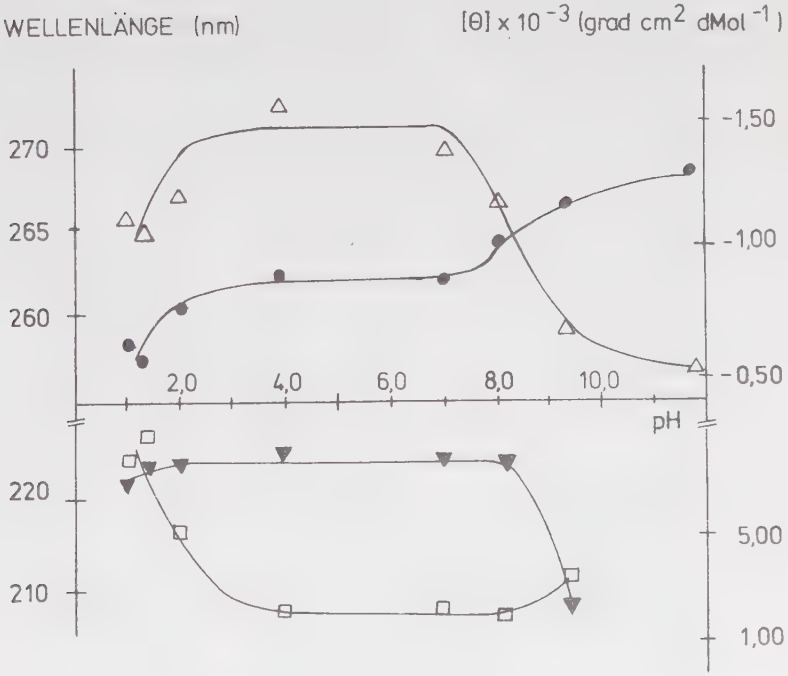
Abb. 11: pH-Abhängigkeit des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts und des Carboxyl-Cotton-Effekts von S-Methylthio-L-cystein 1

●●●● Lage des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts

△△△△ Elliptizität des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts

□□□□ Lage des Carboxyl-Cotton-Effekts

▼▼▼▼ Elliptizität des Carboxyl-Cotton-Effekts



ten sollte. Es scheint daher vernünftig, die Banden schwacher bis mittlerer Intensität bei etwa 678 cm^{-1} und 612 cm^{-1} den CS-Schwingungen zweier Formen zuzuordnen, die sich im Torsionswinkel der CC-SS-Gruppierung unterscheiden [71]. Die für den Aminosäure-anteil charakteristischen Schwingungen treten dagegen als starke bis sehr starke Banden im IR-Spektrum auf; einige dieser Banden sind in Tabelle 2 versuchsweise zugeordnet.

Da mit Hilfe der Raman-Spektroskopie nur die Konformation der Disulfidgruppe ermittelt werden sollte, wurden die Raman-Spektren nur im Bereich von etwa 100 cm^{-1} bis 2000 cm^{-1} aufgenommen. Im Bereich zwischen 502 cm^{-1} und 526 cm^{-1} treten bei allen Verbindungen eine oder mehrere Banden sehr hoher Intensität auf, die der SS-Schwingung der Disulfidgruppe zugeordnet werden können [69,72]. Vor allem bei den S-Alkylthio-L-cysteinen mit langen oder sperrigen Alkylgruppen beobachtet man eine zweite intensive Bande, was darauf hindeutet, daß in den hier untersuchten Festkörpern mindestens zwei Rotamere vorliegen, die sich im Torsionswinkel der CC-SS-Gruppe unterscheiden. Nimmt man an, daß der Torsionswinkel der CS-SC-Gruppierung in allen S-Alkylthio-L-cysteinen ähnlich und gleich dem in L-Cystin ist, so sollte man für die Wellenzahl der SS-Schwingung einen Wert von etwa 500 cm^{-1} erwarten. In Übereinstimmung damit ist eine Abhängigkeit der Wellenzahl von der Art des Alkylsubstituenten nicht festzustellen. Die auch im IR-Spektrum auftretenden Banden bei 678 cm^{-1} und 612 cm^{-1} werden im Raman-Spektrum als Banden mittlerer bis hoher Intensität wiedergefunden, was ihre Deutung als CS-Schwingungen verschiedener Rotamerer unterstützt.

Leider konnten gut aufgelöste Raman-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine in saurer Lösung im allgemeinen nicht erhalten werden. Eine Ausnahme macht S-Propylthio-L-cystein (3), das bei 510 cm^{-1} eine relativ breite,

Tab. 2: Schwingungsfrequenzen der S-Alkylthio-L-cysteine

1	2	3	6	7	9	12	4	11	8	10	
Raman-Spektren											
502	505	503	503	510	504	509	511	506	503		SS stretch
524				522	522	522	526	511		525	
								526			
612	616	613	616	616	620		625	616	613	623	CS stretch
677	678	678	678	677	680		680	679	678	679	
967	969	968	967	969	971	965	966	960	962	967	CC stretch
1307	1304	1296	1302	1299	1305	1298	1305	1301	1299	1307	CH bend
1345	1346	1343	1343	1344	1346	1348	1344	1341	1342	1343	CH deformation
IR-Spektren											
615	613	612	613	614	612		613	614	611	616	CS stretch
679	679	677	679	679	677		677	678	676	679	
1302	1300	1299	1301	1300	1300	1298	1300	1303	1299	1301	CH bend
1345	1344	1343	1346	1343	1343	1350	1341	1343	1341	1342	CH deformation
1414	1415	1413	1416	1415	1414	1419	1412	1413	1412	1412	COO^- sym. stretch
1495	1498	1498	1498	1495	1496	1505	1495	1500	1494	1496	NH_3 sym. deformation
1590	1587	1588	1590	1589	1587	1592	1589	1600	1589	1589	COO^- asym. stretch
1627	1623	1625	1624	1627	1625	1616	1624		1624	1626	NH_3 asym. deformation

intensive Bande zeigt. Weitere etwas schwächere Banden werden bei 629 cm^{-1}, 671 cm^{-1} und 706 cm^{-1} beobachtet. (Tab. 2). Der Wert von 510 cm^{-1} für die SS-Schwingung stimmt gut mit dem von Dipropyldisulfid überein [71].

3.2. L-Glutathion

Der Einfluß des Disulfidchromophors auf den Circulardichroismus von Peptiden zeigt sich sehr deutlich beim Vergleich der CD-Spektren von reduziertem L-Glutathion (G-SH) und oxidiertem L-Glutathion (G-SS-G). Bei G-SH beobachtet man einen negativen Cotton-Effekt bei 217 nm ($[\theta] \approx 5000$ grad cm^2 $dMol^{-1}$) in neutraler Phosphatpufferlösung und die Andeutung eines weiteren negativen Cotton-Effekts mit noch größerer Elliptizität oberhalb von 200 nm (Abb. 12).

Der langwellige Cotton-Effekt ist auf den n $-\pi^*$-Übergang hauptsächlich der Amidgruppe zwischen L-Cystein und Glycin zurückzuführen. Der Beitrag der -Glutamyl-Amidbindung sollte geringer sein, da die Entfernung zwischen der Cysteinyl-Amidbindung von C_α des Cysteins geringer ist als die zwischen der γ-Glutamylbindung und dem C_α des Cysteins. Der Beitrag der Carboxylgruppe der Glutaminsäure zum CD ist anscheinend so gering, daß er durch den Amid-Cotton-Effekt überdeckt wird. Im wesentlichen entspricht das CD-Spektrum von G-SH dem von N-Acetyl-L-cysteinmethylamid, das ebenfalls den n $-\pi^*$-Übergang der Cysteinyl-Amidbindung bei 210 nm zeigt [32]. Cotton-Effekte der Thiolgruppe werden ebensowenig wie bei L-Cystein selbst beobachtet. Die Temperaturabhängigkeit des CD-Spektrums von G-SH ist nur wenig ausgeprägt. Die Lage des Cotton-Effekts bleibt unverändert und auch der Betrag der molaren Elliptizität nimmt nur um einige Prozente ab. Diese Beobachtung ist im Einklang mit chiroptischen Untersuchungen an

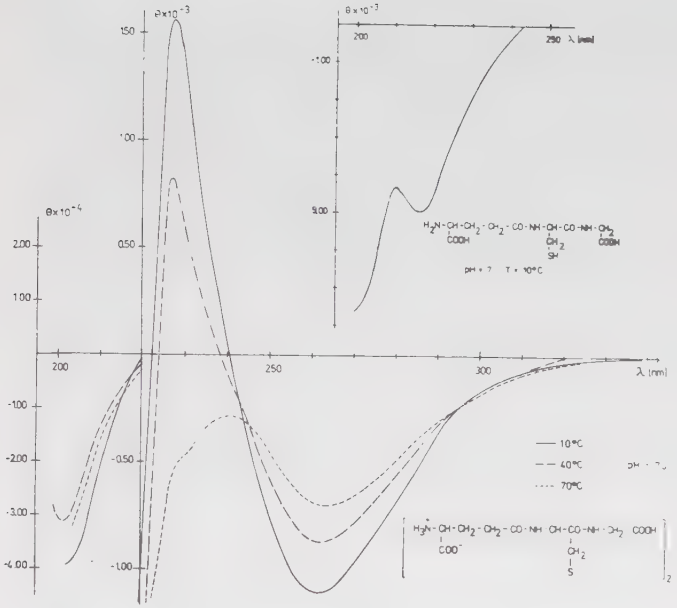


Abb. 12: CD-Spektren von reduziertem und oxidiertem L-Glutathion in neutraler Phosphatpufferlösung

anderen schwefelhaltigen Aminosäuren mit Thiol- oder S-Alkylgruppen, wie L-Methionin, L-Lanthionin oder L-Cystathionin [64,87]. Die hier möglichen Konformationsänderungen beschränken sich lediglich auf Rotationen um CC- und CS-Bindungen.

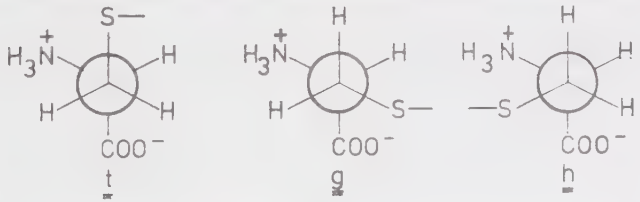
Dagegen zeigt das CD-Spektrum von oxidiertem L-Glutathion (G-SS-G) in neutraler Pufferlösung bei Zimmertemperatur drei Cotton-Effekte im Bereich von 350 nm bis 195 nm (Abb. 12): einen negativen Cotton-Effekt geringer Elliptizität bei 263 nm, einen positiven Cotton-Effekt bei 227 nm und einen starken negativen Cotton-Effekt bei 202 nm. Wieder entsprechen die Cotton-Effekte bei 263 nm und 202 nm Übergängen des Disulfidchromophors, während der Cotton-Effekt bei 227 nm auf den $n \rightarrow \pi^*$-Übergang der Amidbindung zwischen L-Cystein und Glycin zurückzuführen ist. Für die Beiträge der γ-Glutamylbindung sowie der Carboxylgruppen der Glutaminsäure gilt dasselbe wie bei G-SH. Auffallend sind die bathochrome Verschiebung des Amid-Cotton-Effekts um 10 nm sowie die Umkehrung seines Vorzeichens verglichen mit dem Amid-Cotton-Effekt von G-SH. Genau dieselbe Verschiebung und Umkehrung des Cotton-Effekts wurde beim Übergang von N-Acetyl-L-cysteinmethylamid zu N,N'-Diacetyl-L-cystinbismethylamid beobachtet [32]. Die Umkehrung des Vorzeichens kann entweder darauf zurückgeführt werden, daß die für die optische Aktivität verantwortliche störende Gruppe eine verschiedene Orientierung relativ zur Amidbindung im reduzierten bzw. oxidierten Molekül besitzt [88], oder darauf, daß der Mechanismus der Störung in den beiden Molekülen verschieden ist [32]. Es besteht auch die Möglichkeit, daß die Peptidchromophore an beiden Seiten der Disulfidgruppe miteinander koppeln.

Gegenüber den S-Alkylthio-L-cysteinen und L-Cystin in saurer Lösung ist auch der Disulfid-Cotton-Effekt batho-

chrom verschoben. Da keine wesentlichen Abweichungen des Torsionswinkels der CS-SC-Gruppierung gegenüber dem in L-Cystin zu erwarten sind, die eine solche bathochrome Verschiebung verursachen könnten, muß sie ebenfalls auf den Einfluß der Amidbindung zurückzuführen sein. Tatsächlich beobachtet man praktisch bei allen Peptiden mit Disulfidbrücken den längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekt bei längeren Wellenlängen als bei L-Cystin in saurer Lösung [32].

3.2.1. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von G-SS-G

Bei Temperaturerhöhung beobachtet man eine ausgeprägte Abnahme des Betrags der Elliptizität des negativen langwelligen Disulfidübergangs von G-SS-G in neutraler Phosphatpufferlösung (Abb. 12). Zur Erklärung dieser Abnahme sind die beiden Beiträge zur optischen Aktivität der Disulfidgruppe zu berücksichtigen und gegeneinander abzuwägen. Der Versuch, die beobachtete Temperaturabhängigkeit nur durch Änderungen in der Umgebung der Disulfidgruppe zu erklären, erscheint ungenügend, da solche Änderungen nur aufgrund von Rotationen um CS- und CC-Bindungen auftreten können; die Barrieren für solche Rotationen sind aber so niedrig [43,91-94], daß Änderungen der Temperatur im Bereich von 0° C bis 100° C die Verteilung der möglichen Rotameren g, h und t nur wenig beeinflussen. Dies wird auch dadurch gestützt, daß bei



den aromatischen Aminosäuren, bei denen die optische Aktivität der Aromatenabsorption nur auf dem Einfluß der asymmetrischen Umgebung beruht, eine wesentlich ge-

ringere Temperaturabhängigkeit der Elliptizität des Aromaten-Cotton-Effekts beobachtet wird [30]. Eine starke Gleichgewichtsverschiebung der Rotameren g, h und t bei einer Temperaturänderung in diesem Bereich scheidet also aus, was auch durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie bewiesen worden ist [20]. Weiter wäre eine vermehrte Population einer energetisch höher liegenden Disulfidkonformation mit steigender Temperatur denkbar, die gegenüber der bei Zimmertemperatur stabilsten Form einen verengten bzw. aufgeweiteten Torsionswinkel der Disulfidgruppe besitzt; dies müßte sich jedoch in einer Verschiebung des Maximums des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts äußern. Außerdem sollte der bei 202 nm gelegene negative Cotton-Effekt, der ja zum Teil auf einem torsionswinkelunabhängigen Disulfidübergang beruhen soll, nur eine geringe Temperaturabhängigkeit, vergleichbar mit der anderer Amide, aufweisen, was jedoch nicht beobachtet wird.

Als wichtigster Faktor, der die starke Temperaturabhängigkeit des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts bestimmt, bleibt dann die Verteilung der beiden möglichen M- bzw. P-helikalen Konformeren. Eine solche Konformerenumwandlung kommt durch Rotation um die SS-Bindung zustande und sollte sich auf den kurzwelligen Cotton-Effekt mit Disulfidanteil in ähnlicher Weise auswirken wie auf den langwelligen Cotton-Effekt. Bei den S-Alkylthio-L-cysteinen [36,39] und L-Cystin [30] wird dieser ähnliche Verlauf der Abnahme der Elliptizitäten der beiden Disulfid-Cotton-Effekte tatsächlich beobachtet. Bei G-SS-G ist es wegen des großen Fehlers in der Bestimmung der Elliptizität des kurzwelligen Cotton-Effekts leider nicht möglich, den Temperaturkoeffizienten der Elliptizität zu bestimmen, jedoch erkennt man (Abb. 12), daß eine ähnliche Abnahme eintritt wie bei dem Cotton-Effekt bei 262,5 nm.

Abweichend von den S-Alkylthio-L-cysteinen findet man in neutraler Pufferlösung bei G-SS-G auch eine sehr starke Abnahme der Elliptizität des positiven Amid-Cotton-Effekts und bei Temperaturen oberhalb von 50° C sogar eine Umkehrung dieses Cotton-Effekts. Es scheint, daß bei G-SS-G das bei tieferer Temperatur stabilere Konformere einen positiven Cotton-Effekt, das bei höherer Temperatur stabilere Diastereomere dagegen einen negativen Cotton-Effekt besitzt [37]. Dies läßt sich wahrscheinlich durch die intramolekulare Kopplung der Peptidchromophore erklären [33]. Aufgrund ihrer großen Polarisierbarkeit übt außerdem die Disulfidgruppe trotz ihrer Entfernung vom Amidchromophor einen starken Einfluß auf dessen Cotton-Effekt aus.

3.2.2 Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Spektren von oxidiertem L-Glutathion

Die Beeinflussung der Amidgruppen durch die Disulfidbrücke von G-SS-G läßt sich mit Hilfe der ^{13}C-NMR-Spektroskopie nachweisen. Abb. 13 zeigt die ^{13}C-NMR-Spektren von G-SH und G-SS-G in neutraler Phosphatpufferlösung. Die Verschiebung des Signals von C_β des Cysteins um mehr als 13 ppm nach tiefem Feld und die entsprechende Verschiebung von C_α um etwa 3 ppm nach höherem Feld bei der Oxidation von G-SH zu G-SS-G ist auf den verstärkten Elektronenentzug an C_β durch die Disulfidgruppe, verglichen mit der Thiolgruppe, zurückzuführen. Dieser hat eine geringere Elektronendichte und damit eine geringere Abschirmung von C_β zur Folge; gleichzeitig wird C_α stärker abgeschirmt. Aus den ^{13}C-NMR-Untersuchungen kann außerdem geschlossen werden, daß mit Ausnahme der unmittelbaren Umgebung der Disulfidbrücke in G-SS-G die Konformation von G-SH erhalten bleibt [95,96]. Das Auftreten von nur einem Signal für je zwei Kohlenstoffatome zeigt auch, daß in G-SS-G, wie in allen symmetrischen Disulfiden, eine exakte C_2-Sym-

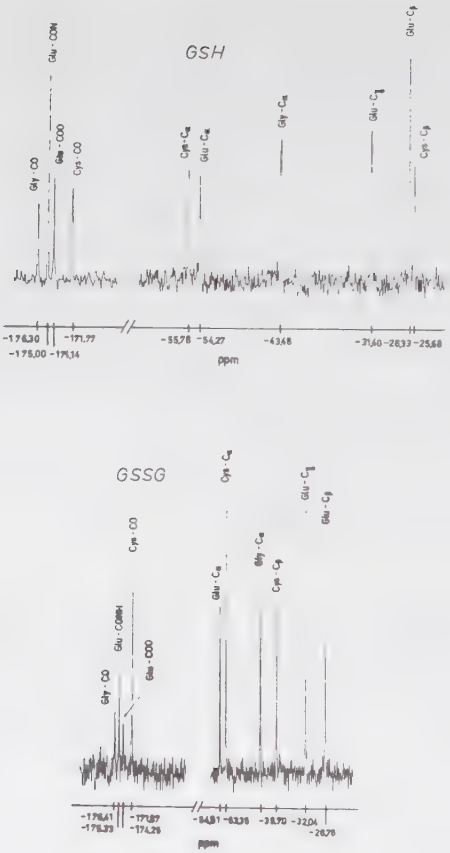


Abb. 13: ^{13}C-NMR-Spektren von reduziertem und oxidiertem L-Glutathion in neutraler Phosphatpufferlösung bei 20° C

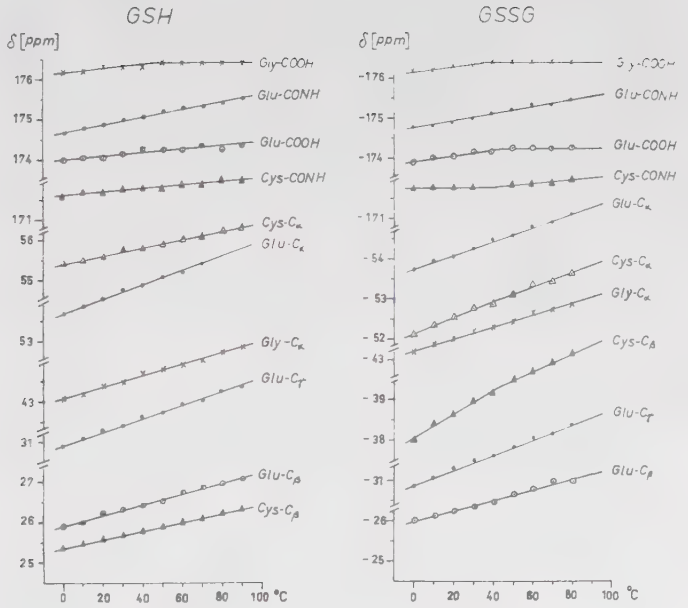


Abb. 14: Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Signale vor reduziertem und oxidiertem L-Glutathion in neutraler Phosphatpufferlösung

metrie vorliegt.

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Spektren von G-SH und G-SS-G sollte Aufschlüsse über die Konformationsänderungen in der Umgebung der Disulfidgruppe beim Übergang von G-SH zu G-SS-G geben können. Abb. 14 faßt die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen. Bei Temperaturerhöhung von 5° C auf 90° C erfolgt bei allen Resonanzsignalen eine Verschiebung nach tiefem Feld mit relativ kleinen Temperaturkoeffizienten für die Carboxylkohlenstoffatome von Glycin und der Glutaminsäure sowie für den Carbonylkohlenstoff des Cysteins (Tab. 3). Vergleicht man nun die temperaturbedingten Verschiebungen der ^{13}C-Resonanzen von G-SH mit denen von G-SS-G, so findet man nur bei zwei Signalen interessante Unterschiede, nämlich bei den Resonanzen von C und C des Cystins in G-SS-G. Alle anderen Signalverschiebungen der sich entsprechenden Kohlenstoffatome in G-SH und G-SS-G sind vergleichbar, was auf die ähnliche Beweglichkeit sich entsprechender Gruppen zurückzuführen ist. Die Signalverschiebungen von C_α und C_β des Cystins in G-SS-G zeigen dagegen wesentlich höhere Temperaturkoeffizienten, verglichen mit den entsprechenden Verschiebungen des Cysteins in G-SH. Außerdem sind sie, im Gegensatz zu den übrigen Verschiebungen, nicht linear, sondern haben einen Knick bei etwa 45° C, was auf zwei verschiedene Konformationen bei tiefer und bei höherer Temperatur zurückgeführt wird [95].

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die beobachteten Effekte reversibel sind und innerhalb von 0,1 ppm reproduziert werden können. Diese ^{13}C-Untersuchungen unterstützen also den Befund aus den CD-Spektren, daß zwei verschiedene Konformationen in neutraler Lösung auftreten, die sich in der Orientierung der Disulfidgruppe relativ zu den Amidbindungen von G-SS-G unterscheiden.

Tab. 3: Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-Verschiebungen von G-SH und G-SS-G (Koeffizienten in ppm/° C)

a) Carbonylbereich

	GluCOO	GluCON	CysCON	GlyCOO
G-SH	0,045	0,095	0,045	0,025
G-SS-G	0,035	0,090	0,025	0,025

b) Bereich der aliphatischen C-Atome

	Glu-C_α	Glu-C_β	Glu-C_γ	Cys-C_α	Cys-C_β	Gly-C_α
G-SH	0,180	0,13	0,175	0,10	0,11	0,145
G-SS-G	0,185	0,13	0,190	0,175	0,250	0,145

3.2.3. Lösungsmittelabhängigkeit der CD-Spektren von oxidiertem Glutathion

Die CD-Spektren von G-SS-G in Äthanol/1 N HCl (9:1, v/v) unterscheiden sich in wesentlichen Einzelheiten von jenen in neutraler Lösung. Vergleicht man die Lage und die Elliptizitäten der Cotton-Effekte in beiden Lösungsmitteln bei derselben Temperatur (Tab. 4), so fallen zunächst die höheren Werte der Elliptizitäten in Äthanol/1 N HCl auf. Man kann annehmen, daß in diesem Lösungsmittelgemisch, in dem die Carboxylgruppen protoniert sind, die Konformation mit dem positiven Cotton-Effekt der Amidgruppe bis zu höherer Temperatur stabil bleibt als in neutraler Lösung. Tatsächlich beobachtet man auch bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren in Äthanol/0,1 N HCl (Abb. 15) noch bei 45° C einen ausgeprägten positiven Amid-Cotton-Effekt. Auffallend ist aber auch, daß im Gegensatz zu den S-Alkylthio-L-cysteinen, der langwellige Disulfid-Cotton-Effekt in der sauren Lösung um 5 nm bathochrom gegenüber dem in neutraler Lösung verschoben ist. Da in der sauren äthanolischen Lösung noch keine Protonierung der Amidgruppen zu erwarten ist, muß man annehmen, daß der

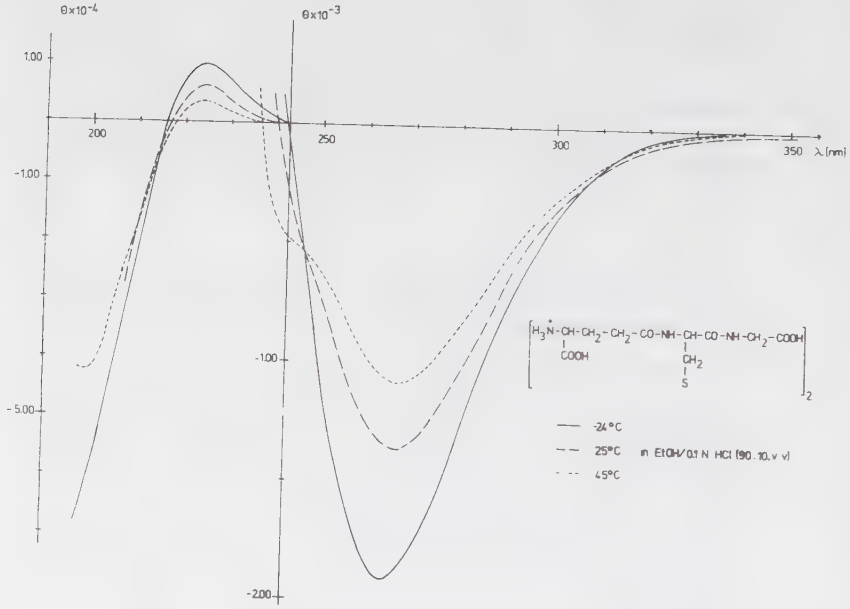


Abb. 15: Temperaturabhängigkeit der Cotton-Effekte von G-SS-G in Äthanol/0,1 N HCl (90:10, v/v)

Cotton-Effekt der Disulfidgruppe durch die Protonierung wahrscheinlich der Glycin-Carboxylgruppe so beeinflußt wird, daß eine bathochrome Verschiebung auftritt. Dies stimmt im übrigen mit einer pH-abhängigen Untersuchung der CD-Spektren von G-SS-G überein [31], die zeigt, daß mit steigendem pH-Wert der Lösung eine hypsochrome Verschiebung des Disulfid-Cotton-Effekts und eine bathochrome Verschiebung des Amid-Cotton-Effekts auftritt. Während für den Amid-Cotton-Effekt Übereinstimmung zwischen den hier gemessenen und bereits publizierten Parametern [20] besteht, ergeben sich für den Disulfid-Cotton-Effekt Differenzen. Literaturspektren von G-SS-G bei pH = 3 [32] zeigen eine stark verbreiterte Disulfidbande, die in der vorliegenden Arbeit bei Zimmertemperatur nicht beobachtet wird. Dagegen tritt ab 45° C allmählich ein zweiter negativer Cotton-Effekt bei etwa 240 nm auf, der mit steigender Temperatur immer intensiver wird (Abb. 15). Er bleibt jedoch auch beim Abkühlen erhalten und ist deshalb auf eine Form von G-SS-G zurückzuführen, die irreversibel beim Erhitzen saurer Lösungen von G-SS-G entsteht. Die in der Literatur beobachtete Verbreiterung, "die typisch für oxidiertes L-Glutathion ist" [32], beruht wahrscheinlich auf einem ähnlichen irreversiblen Prozess.

Noch drastischere Veränderungen des CD-Spektrums beobachtet man bei Lösungen von G-SS-G in Hexafluoraceton-Trihydrat. Im Bereich zwischen 350 nm und 200 nm tritt nur noch ein schwach negativer Cotton-Effekt bei 252 nm auf, während sich nach höherer Energie ein steiler Abfall der Ellipticität anschließt; ein weiteres Minimum ist nicht zu erkennen (Abb. 16). Die ausgeprägte hypsochrome Verschiebung des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts bestätigt, daß das Ausgangsorbital des entsprechenden Disulfidübergangs nichtbindenden Charakter besitzt. Der $n - \pi^*$-Amidübergang ist nicht mehr zu sehen, er ist durch den abfallenden Ast des benachbarten Cotton-Effekts bei

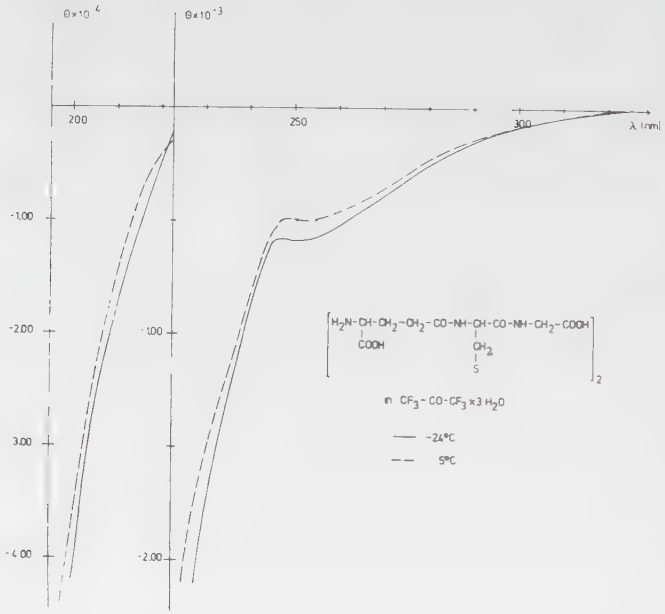


Abb. 16: Temperaturabhängigkeit der Cotton-Effekte von G-SS-G in Hexafluoraceton-Trihydrat

höherer Energie überdeckt. Trotz der starken Verschiebung nach kurzen Wellenlängen zeigt dieses CD-Spektrum doch Ähnlichkeit mit den Spektren in wäßriger Lösung bei höherer Temperatur. Es scheint also, daß in diesem Lösungsmittel die Konformation von G-SS-G schon bei tiefer Temperatur stabil ist, welche in wäßrigen Lösungen erst bei höherer Temperatur eine größere Population aufweist. Bei dieser Stabilisierung spielen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen G-SS-G und Hexafluoraceton-Trihydrat sicher eine entscheidende Rolle [36,37].

Das unsymmetrische Disulfid S-Methylthio-L-glutathion ergibt ein dem G-SS-G ähnliches CD-Spektrum (Abb. 16). In 1 N HCl bei 25° C zeigt es geringere Elliptizitäten der Cotton-Effekte als G-SS-G; vor allem ist die Elliptizität des Amid-Cotton-Effekts erwartungsgemäß stark verringert. Die Temperaturabhängigkeit des Circulardichroismus von S-Methylthio-L-glutathion in 1 N HCl unterscheidet sich ebenfalls nicht wesentlich von der des oxidierten L-Glutathions.

Tab. 4: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von G-SH und G-SS-G

	λ nm	$[\Theta]$ grad cm^2 dMol^{-1}
Reduziertes L-Glutathion	217,5	- 4940
Phosphatpuffer pH=7, T=20° C		
S-Methylthio-L-glutathion	267	- 790
1 N HCl, T=25° C	226	1940
Oxidiertes L-Glutathion	262,5	- 950
Phosphatpuffer pH=7, T=30° C	228	1050
Oxidiertes L-Glutathion	267,5	- 1560
Äthanol/0,1 N HCl, T=25° C	225	6250
Oxidiertes L-Glutathion	252	- 500
CF_3-CO-CF_3 x 3 H_2O, T=5° C		

3.2.4. Raman-Spektren von oxidiertem L-Glutathion

Die Raman-Spektren von festem G-SS-G und von G-SS-G in wäßriger Lösung bei pH = 3 sind in Abb. 17 zusammen mit dem Raman-Spektrum von festem L-Cystin dargestellt. Sowohl im festen als auch im gelösten Zustand tritt die SS-Schwingung bei 516 cm^{-1} und die CS-Schwingung bei etwa 670 cm^{-1} auf. Überhaupt ist kein großer Unterschied zwischen dem Festkörper- und dem Lösungsspektrum zu bemerken, was wohl darauf beruht, daß das feste G-SS-G amorph vorliegt. Bemerkenswert ist jedoch die im Vergleich zu den S-Alkylthio-L-cysteinen und L-Cystin hohe SS-Schwingungswellenzahl, die am ehesten mit den Disulfid-Schwingungsbanden in L-Cystin x 2 HCl oder L-Cystin x 2 HBr [82] korrelierbar ist. Diese Frequenz entspricht unter Annahme der Zulässigkeit einer linearen Beziehung zwischen Torsionswinkel der CS-SC-Gruppierung und der Wellenzahl der SS-Schwingung einem Torsionswinkel von 81° [97]. Da jedoch nicht bekannt ist, wie diese Abhängigkeit oberhalb von $\phi = 90°$ aussieht, erscheint es verfrüht, aus diesem Wert von $\phi = 81°$ und dem gemessenen CD-Spektrum die Helizität der Disulfidgruppe in G-SS-G vorherzusagen.

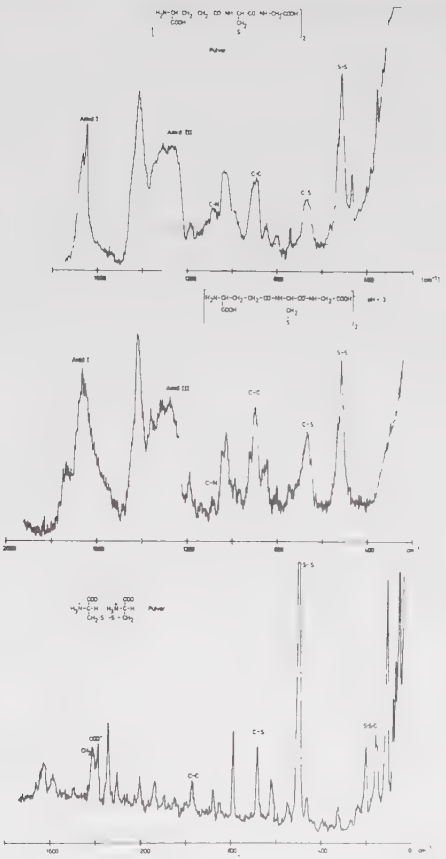
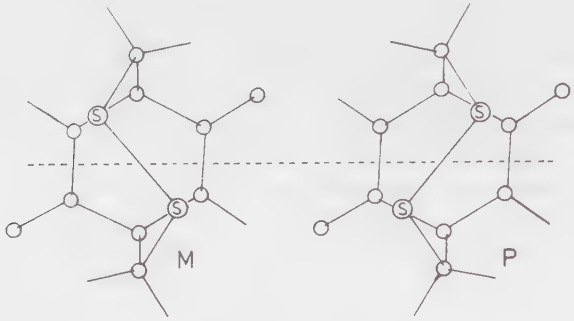


Abb. 17: Raman-Spektren von festem G-SS-G, von G-SS-G in saurer Lösung (pH = 3) und von festem L-Cystin

3.3. Cyclo-L-cystin

Cyclo-L-cystin, das Diketopiperazin des L-Cystins, hat in den letzten Jahren als Testfall für die Gültigkeit theoretischer Vorstellungen über die chiroptischen Eigenschaften der Disulfide eine besondere Bedeutung erlangt. Molekülmodelle zeigen, daß Cyclo-L-cystin einen wannenförmigen Diketopiperazinring ausbilden kann, der durch eine Disulfidbrücke mit einem Torsionswinkel von $\phi = 90^{\circ}$ überbrückt wird. Eine solche Struktur stimmt mit den Ergebnissen von ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Untersuchungen überein [22,98].



Nach der Theorie sollte ein Molekül mit Disulfidgruppe, die diesen Torsionswinkel aufweist, keine optische Aktivität im Bereich der langwelligen Disulfidabsorption besitzen [52,54,58]. Zusätzliches Interesse erregt die Frage, ob in diesem relativ starren Molekül eine Konformationsumwandlung durch Rotation um die Disulfidgruppierung, also eine Umwandlung des Konformeren mit M-Helizität in die P-helikale Konformation der Disulfidgruppe, und umgekehrt, auftreten kann.

Eine erste Untersuchung des Cyclo-L-cystins mit Hilfe der ^{1}H-NMR-, der ^{13}C-NMR- und der UV-Spektroskopie, sowie mittels des Circulardichroismus und der Optischen Rotationsdispersion wurde 1972 publiziert [22]. Man kam

zu dem Schluß, daß in Lösungen von Cyclo-L-cystin in Dimethylsulfoxid eine P-helikale Disulfidbrücke vorherrscht. Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren zeigten jedoch auch, daß geringe Mengen einer "Verunreinigung" [22] vorlagen, die auf Cyclo-L-cystin in M-helikaler Konformation hinwiesen.

3.3.1. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von Cyclo-L-cystin

Im Gegensatz zu den CD-Spektren offenkettiger Disulfide zeigt das CD-Spektrum von Cyclo-L-cystin in Übereinstimmung mit der Theorie keinen Cotton-Effekt im Bereich der langwelligen Disulfidabsorption. In Trifluoräthanol beobachtet man deshalb im gemessenen Bereich von 350 nm bis 190 nm nur zwei intensive Cotton-Effekte (Abb. 18): einen negativen Cotton-Effekt bei 222 nm und einen starken positiven Cotton-Effekt bei 194 nm. Der negative Cotton-Effekt entspricht nach seiner Lage dem $n-\pi^*$-Übergang der cis-Amidbindungen. Unter Anwendung der Oktantenregel für Carbonylverbindungen [67] auf diesen Cotton-Effekt wurde auf das Vorliegen der P-helikalen Struktur der Disulfidbrücke geschlossen [22]. Der stark positive Cotton-Effekt bei 194 nm entspricht sicher einer Überlagerung des $\pi-\pi^*$-Übergangs der Amidgruppen und eines Disulfidübergangs; die Einzelbeiträge der beiden Übergänge lassen sich jedoch nicht getrennt erfassen. Die Vorzeichen der beiden Cotton-Effekte sind, verglichen mit dem Amid-Cotton-Effekt und dem kurzwelligen Cotton-Effekt bei etwa 200 nm des L-Glutathions, genau umgekehrt; ebenso sind ihre Rotationsstärken bedeutend höher. Dies kann zum Teil auf die konformative Starrheit von Cyclo-L-cystin, zum Teil darauf zurückgeführt werden, daß die geometrische Anordnung der beiden cis-Amidgruppen ideal für das Auftreten starker elektrischer Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ist [99].

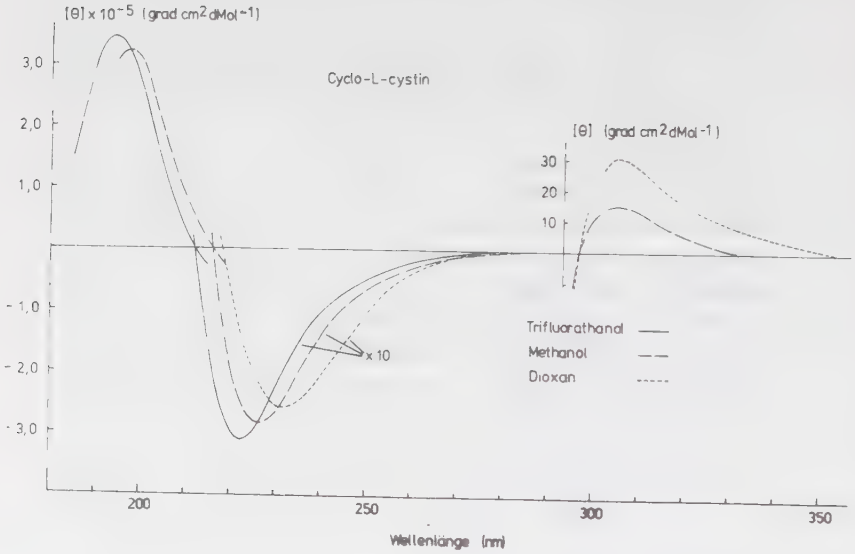
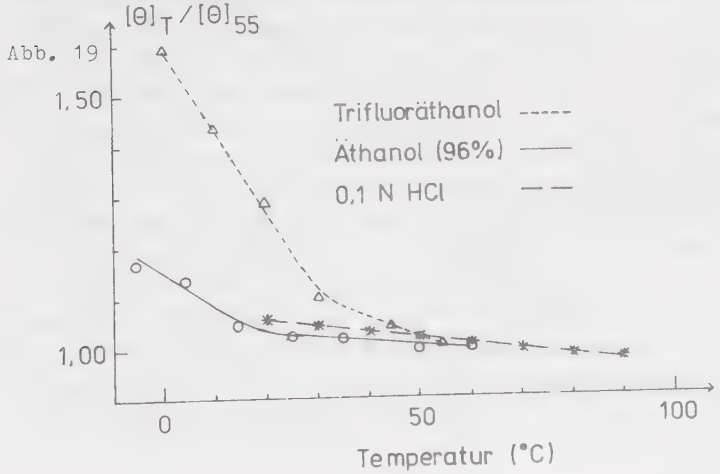


Abb. 18: OD-Spektren von Cyclo-L-cystin bei 20° C

Die Temperaturabhängigkeit des Circulardichroismus von Cyclo-L-cystin in Trifluoräthanol zeigt zunächst kaum Ähnlichkeit mit der der bisher diskutierten Cystinverbindungen. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da praktisch keine Rotation außer der gehinderten Umklappung eines Diastereomeren mit P-Helizität in ein solches mit M-Helizität der Disulfidgruppe und umgekehrt möglich ist. Das Fehlen des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts verringert die Chance, diese Umwandlung im CD-Spektrum direkt zu beobachten. Bei einer Temperaturänderung von 0° C auf 55° C tritt eine Gesamtabnahme des Betrags der Elliptizität des 222 nm-Cotton-Effekts um etwa 38% auf, während der kurzwellige Cotton-Effekt um nur 26% abnimmt. Trägt man das Verhältnis der molaren Elliptizität $[\Theta]_T$ des Amid-Cotton-Effekts bei einer bestimmten Temperatur T zu $[\Theta]_{55}$ bei T = 55° C gegen die jeweilige Temperatur auf, so ergibt sich ein Teil eines sigmoiden Kurvenverlaufs, wie er für Diastereomere, die sich ineinander umwandeln können, charakteristisch ist (Abb. 19); ein solcher sigmoider Kurvenverlauf wurde bei L-Cystin [30], N,N'-Diacetyl-L-cystinbismethylamid [33] und den S-Alkylthio-L-cysteinen [36,37,39] für die Abhängigkeit des Elliptizitätsverhältnisses von der Temperatur beobachtet.

Abb. 19



Unterhalb von 40° C liegt offensichtlich das stabilere Diastereomere mit P-Helizität im Überschuß vor, wandelt sich aber mit steigender Temperatur immer mehr in das M-helikale Disulfid mit einem weniger negativen Cotton-Effekt um; oberhalb von 40° C ist nur noch ein schwacher Abfall dieses $[\theta]_T/[\theta]_{55}$-Verhältnisses zu beobachten, entsprechend dem Vorliegen beider möglichen Diastereomeren zu gleichen Teilen. Wenn also auch der Amid-Cotton-Effekt des Cyclo-L-cystins nur mittelbar von der Änderung der Disulfidkonformation betroffen wird, ist doch der sigmoide Verlauf seiner Temperaturabhängigkeit ein Beweis dafür, daß auch bei Cyclo-L-cystin eine Konformationsumwandlung möglich ist.

3.3.2. Lösungsmittelabhängigkeit der CD-Spektren von Cyclo-L-cystin

Auch in Äthanol (96%) und 0,1 N HCl ergeben sich ähnliche Spektren wie in Trifluoräthanol. Die Elliptizitäten sind aber für beide Cotton-Effekte niedriger als in Trifluoräthanol. Die Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren in Äthanol und 0,1 N HCl unterscheidet sich jedoch von der in Trifluoräthanol erheblich. In 0,1 N HCl beobachtet man eine lineare Abnahme der Elliptizität des $n \rightarrow \pi^*$-Cotton-Effekts im Temperaturbereich von 20° C bis 100° C. In Äthanol tritt zwar, wie in Trifluoräthanol, ein Knick in der gegen die Temperatur aufgetragenen $[\theta]_T/[\theta]_{55}$-Kurve auf (Abb. 19), der jedoch um mehr als 10° C bei tieferer Temperatur liegt. Es scheint also, daß durch Trifluoräthanol die bei tiefer Temperatur stabilere Konformation des Cyclo-L-cystins stärker stabilisiert wird als durch Äthanol.

Auch in Dioxan und Methanol treten der kurzwellige positive und der längerwellige negative Cotton-Effekt mit einer gegenüber den Trifluoräthanol-Lösungen verminderten molaren Elliptizität auf. Erwartungsgemäß verschiebt

sich der Cotton-Effekt, der dem n $\rightarrow \pi^*$-Übergang der Amidgruppen entspricht, mit wachsend r Polarität des Lösungsmittels hypsochrom: von 231 nm in Dioxan auf 222 nm in Trifluoräthanol (Tab. 5). Ebenso wird eine Verschiebung des kurzwelligen Übergangs von 198 nm in Äthanol über 197 nm in Methanol bis 194 nm in Trifluoräthanol beobachtet.

Tab. 5: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von Cyclo-L-cystin

Lösungsmittel	Temperatur	λ (nm)	[θ] (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
Dioxan	20° C	305	31
		231	- 51480
Methanol	20° C	305	16
		226	- 56000
		197	327070
Äthanol (96%)	25° C	227,5	- 51100
		198,5	259850
0,1 N HCl	20° C	224	- 52870
Trifluoräthanol	20° C	222	- 62130
		194	360340

Dagegen tritt in Methanol und Dioxan bei etwa 305 nm ein weiterer, sehr schwacher positiver Cotton-Effekt auf (Abb. 18). Dieser Cotton-Effekt ist nur wenig temperaturabhängig und nicht der Disulfidgruppe zuzuschreiben. Auch eine Abhängigkeit seiner Lage und/oder Elliptizität von der Art des Lösungsmittels ist kaum festzustellen. Der Ursprung dieses bislang nicht beobachteten Cotton-Effekts läßt sich nur schwer erklären. Da sorgfältig gereinigtes, kristallines Cyclo-L-cystin eingesetzt wurde, kann es sich sicher nicht um eine Verunreinigung handeln. In Analogie zu 6,8-Thioctsäure könnte man annehmen, daß durch die unterschiedliche

Störung des Amidübergangs durch die Disulfidgruppe in der P- bzw. M-helikalen Konformation die Intensitäten der Schwingungskomponenten dieses Übergangs und damit die Bandenkonturen in den beiden Formen verschieden sind. Damit wird die CD-Bande der einen Konformation durch die flachere, breitere Bande der anderen mit entgegengesetztem Vorzeichen überlagert [25] und ruft den schwachen positiven Cotton-Effekt hervor. Dafür spricht, daß diese CD-Bande unsymmetrisch zu ihrem Maximum verläuft, da sie nach der kurzwelligen Seite wesentlich schneller abnimmt als nach der langwelligen (Abb. 18). Außerdem wäre es denkbar, daß ein energetisch oberhalb von 300 nm gelegener positiver Cotton-Effekt durch den negativen Amid-Cotton-Effekt so überlagert wird, daß sich ein scheinbares positives Maximum unterhalb von 300 nm ergibt. Dieser positive Cotton-Effekt könnte auf einem charge-transfer-Übergang eines Elektrons aus einem besetzten n_a, n_b-Orbital des Schwefels in das antibindende π-Orbital der Amidgruppen beruhen, wie er auch bei den Epidithiadiketopiperazinen beobachtet wird [100]. In der P-helikalen Form von Cyclo-L-cystin sind die Schwefel- und die Carbonylkohlenstoff-atome so eng benachbart, daß ein solcher charge-transfer-Übergang möglich scheint. Im UV-Spektrum ist dieser Übergang allerdings nicht zu beobachten, immerhin könnte er durch den Disulfidübergang bei etwa 250 nm verdeckt werden. Jedoch spricht auch die fehlende Lösungsmittelabhängigkeit dieses Cotton-Effekts gegen die Annahme eines charge-transfer-Übergangs. Die Aufklärung der Ursache dieses positiven Cotton-Effekts bedarf also weiterer sorgfältiger Untersuchungen.

3.3.3. Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Spektren von Cyclo-L-cystin

Die Messung der Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Spektren des Cyclo-L-cystins wurde unternommen, um wei-

tere Hinweise auf die Konformationsumwandlung der Disulfidbrücke zu erhalten und um die Energiebarriere dieses Vorgangs abzuschätzen. Die Bestimmung von Energiebarrieren mittels der ^{13}C-NMR-Spektroskopie kann exakt nur durch vollständige Linienformanalyse erfolgen [101-103]. Im Falle des Cyclo-L-cystins mußte aber darauf verzichtet werden, da die Population der beiden Konformationen zu unterschiedlich ist. Vor allem bei dem in geringer Konzentration vorliegenden Konformeren kann eine Linienverbreiterung nicht beobachtet werden, da das Signal/Rauschen-Verhältnis der Linien dieses Konformeren nur klein ist. Ein verbessertes Signal/Rauschen-Verhältnis für diese Linien müßte mit wesentlich längeren Aufnahmezeiten der Spektren erkauft werden. Entsprechend beobachtet man für die intensiven Signale nur minimale Verbreiterungen.

Abb. 20 zeigt die ^{13}C-NMR-Spektren von Cyclo-L-cystin in Dimethylsulfoxidlösung bei verschiedenen Temperaturen. Unterhalb von 45° C beobachtet man neben den drei intensiven Signalen jeweils drei weitere schwache Resonanzen. Das Auftreten von nur jeweils drei Linien für die beiden Konformationen zeigt, daß beide exakte C_2-Symmetrie aufweisen. Das stärkere Signal des Carbonylkohlenstoffatoms liegt bei tieferem Feld, was für das Überwiegen der P-Konformation der Disulfidbrücke spricht, in der eine enge räumliche Nachbarschaft zwischen der Disulfidgruppe und der Carbonylgruppe besteht. Dadurch wird das Carbonylkohlenstoffatom stärker entschirmt und erscheint daher bei tieferem Feld als in dem M-helikalen Molekül.

Mit steigender Temperatur erfolgt eine ganz geringfügige Verschiebung der Signale, und oberhalb von 50° C sind die schwachen Linien verschwunden. Hier erfolgt also eine so schnelle Umwandlung der Diastereomeren, daß im NMR-Spektrum nur die Mittelung der Signale der beiden

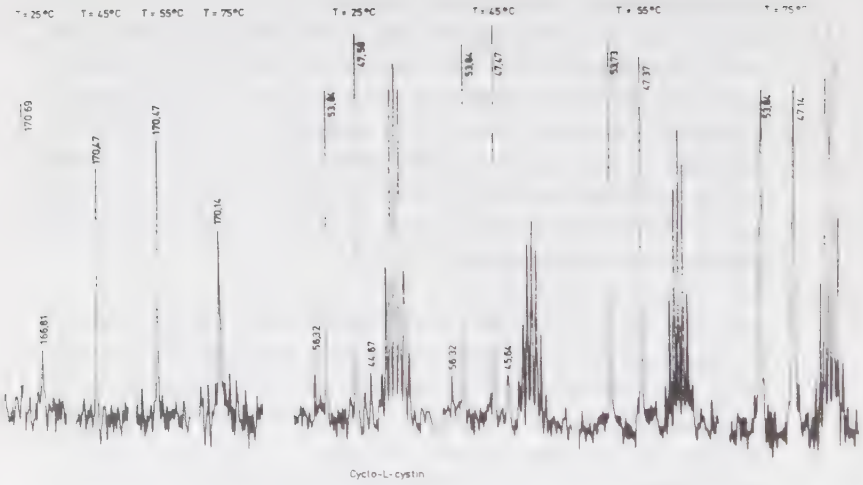


Abb. 20: Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Signale von Cyclo-L-cystin in DMSO-d_6

Formen beobachtet wird. Mit steigender Temperatur sieht man dann eine starke Verschiebung der gemittelten Signale, eine Verminderung der Linienbreite wird jedoch nicht beobachtet.

Trotz der der Koaleszenzpunktmethode anhaftenden Schwächen bei der Bestimmung von Energiebarrieren aus ^{13}C-NMR-Spektren können die hier gemessenen temperaturabhängigen Spektren doch zumindest zu einer Abschätzung der unteren Grenze dieser Energiebarriere für die Umwandlung der P- in die M-helikale Konformation der Disulfidbrücke herangezogen werden. Aus einem Diagramm, in dem der Abstand der Resonanzen $\Delta\nu$ der beiden Konformationen, extrapoliert auf die Koaleszenztemperatur T, logarithmisch gegen die Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\ddagger}$ mit T als Parameter aufgetragen ist [101], kann diese untere Grenze ermittelt werden. Die Frequenzabstände der Resonanzen von C_α, C_β und dem Carbonylkohlenstoffatom betragen, extrapoliert auf eine Temperatur von 50° C, 2,48 ppm, 1,83 ppm und 3,89 ppm. Als untere Grenze für G ergeben sich daraus Werte von 15,6 kcal/Mol bis 16,0 kcal/Mol. Die höchsten bisher beobachteten Rotationsbarrieren um die Disulfidgruppe, die an sterisch stark behinderten Diaryldisulfiden gemessen wurden, betrugen 15,7 kcal/Mol [104] und können ebenfalls nur als untere Grenzwerte für diesen Prozess betrachtet werden [40]. Wenn auch, wegen der unterschiedlichen Relaxationszeiten der ^{13}C-Kerne, die Linienintensitäten der ^{13}C-NMR-Signale nicht wie in der ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur quantitativen Bestimmung des Anteils einzelner Konformere benutzt werden können, so erlauben sie doch zumindest eine grobe Abschätzung dieser Anteile. Aus den gemessenen Intensitäten der ^{13}C-NMR-Signale der beiden Cyclo-L-cystin-Konformationen erhält man ein Verhältnis von 5 : 1 bis 7,1 : 1, d.h. der prozentuale Anteil des weniger stabilen M-helikalen Konformeren beträgt zwischen 14% und 20% bei 25° C. Alle diese Messungen wurden in

Dimethylsulfoxid durchgeführt; Messungen in anderen Lösungsmitteln waren wegen der schlechten Löslichkeit von Cyclo-L-cystin nicht möglich.

3.3.4. IR- und Raman-Spektren von Cyclo-L-cystin

Abb. 21 zeigt das Raman-Spektrum von festem Cyclo-L-cystin im Vergleich zu seinem IR-Spektrum. Wieder sind im Raman-Spektrum die SS- und die CS-Schwingungen wesentlich intensiver als im IR-Spektrum. Dort beobachtet man bei 517 cm^{-1} lediglich eine schwache Bande, während im Raman-Spektrum zwei intensive Banden bei 511 cm^{-1} und 521 cm^{-1} auftreten. Diese Banden sind sicher der SS-Schwingung zuzuordnen; es ist jedoch unwahrscheinlich,

Tab. 6: Schwingungsfrequenzen von Cyclo-L-cystin und ihre Zuordnung

Frequenzen cm^{-1} IR	Raman	Zuordnung
	186	Symmetrische SSC-Deformation
517	511	SS-Streck-Schwingung
	521	
	647	CS-Streck-Schwingung
668	669	
831	835	CH_2 rock; Ringdeformation
912	918	C'O, NH-Deformation
995	997	C'C-Streck-Schwingung
1118	1113	CN-Streck-Schwingung
1452	1452	CH_2-Deformation
1521	1527	C'O-Streck-Schwingung; NH-Deform.
1695	1707	C'O, C'N-Streck-Schwingung

daß die zwei Banden im Raman-Spektrum den zwei möglichen Konformationen von Cyclo-L-cystin entsprechen, da zur Messung des Spektrums Kristalle verwendet wurden, die nur eine bevorzugte Konformation aufweisen sollten.

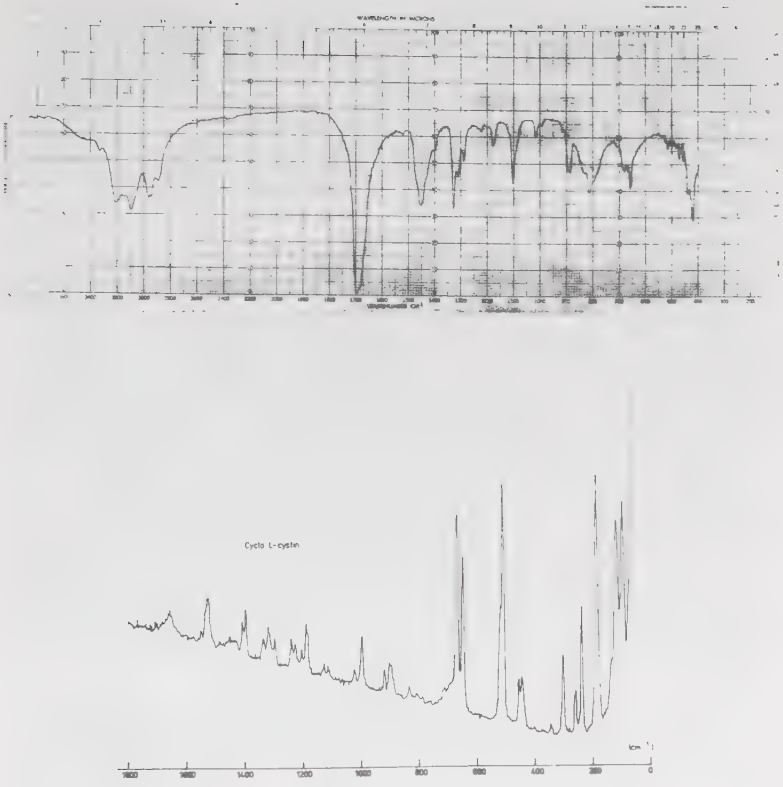


Abb. 21: IR- und Raman-Spektren von festem Cyclo-L-cystin

Es wäre möglich, daß die Anordnung der Moleküle im Kristall so ist, daß es zu einer Kopplung zwischen den Disulfidgruppen und damit zu einer Aufspaltung der SS-Schwingungsfrequenz kommen kann. Weitere, vor allem für den Diketopiperazinring charakteristische Frequenzen sind in Tabelle 6 aufgeführt und versuchsweise zugeordnet [105].

3.3.5. Cyclo-L-cystin-Derivate

Öffnet man eine der beiden cis-Amidbindungen des homodetisch und heterodetisch gebauten Cyclo-L-cystins, so erhält man L-Cysteinyl-cystein-disulfid. Der Circulardichroismus des Hydrochlorids dieses kleinsten Cyclodipeptids mit heterodetischem Ring 1 wurde gemessen, um die Auswirkung der Ringöffnung auf den Disulfidchromophor und auf die Umwandlungsmöglichkeit der Diastereomeren zu erfassen. Außerdem wurden zwei Derivate, L-Cysteinyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid 2 und tert.-Butyloxycarbonyl-L-cysteinyl-cystein-disulfid-methylester 3 untersucht.

3.3.5.1. CD-Spektren von L-Cysteinyl-cystein-disulfid-hydrochlorid 1, L-Cysteinyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid 2 und tert.-Butyloxycarbenyl-L-cysteinyl-cystein-disulfid-methylester 3

Theoretische Berechnungen der Konformation von 1 sagen voraus, daß in diesem Molekül eine nicht völlig planare cis-Amidgruppe vorliegen muß, während die übrigen Bindungslängen und -winkel, vor allem der Disulfidgruppe, ähnliche Werte wie in offenkettigen Verbindungen annehmen sollten. Weiter ergibt sich, daß die Gesamtenergien der beiden Konformationen P bzw. M sich nur wenig unterscheiden [106]. Unter diesen Voraussetzungen würde man erwarten, daß ähnlich wie in Lösungen von z.B. oxidier-

tem L-Glutathion, ein relativ schwacher Cotton-Effekt im Bereich von etwa 250 nm bis 265 nm auftritt. Dieser sollte eine ähnliche Temperaturabhängigkeit zeigen, wie sie bei oxidiertem L-Glutathion oder L-Cystin beobachtet wird; man darf ja davon ausgehen, daß in 1 ebenso wie in Cyclo-L-cystin eine Diastereomerenumwandlung eintreten kann.

Das CD-Spektrum von 1 in Äthanol (100%) bei 20° C sieht jedoch völlig anders aus (Abb. 22). Auf einen äußerst schwachen negativen Cotton-Effekt bei 290 nm folgt ein starker positiver Cotton-Effekt im Bereich der Amidabsorption; daran schließt sich ein negativer Cotton-Effekt mit noch größerer Elliptizität bei 201,5 nm an. Abgesehen von dem längstwelligen Cotton-Effekt sieht das CD-Spektrum von 1 ähnlich wie das von Cyclo-L-cystin aus, nur daß die Vorzeichen der Cotton-Effekte umgekehrt und die Elliptizitäten etwa um den Faktor vier kleiner sind. Die drastische Reduktion des Betrags der Elliptizitäten und die Vorzeichenumkehr der Cotton-Effekte lassen sich wohl darauf zurückführen, daß bei 1, im Gegensatz zu Cyclo-L-cystin, keine cis-Amidgruppen mehr vorhanden sind, die miteinander in Wechselwirkung treten könnten. Ganz sicher ist auch die Orientierung der Disulfidgruppe für dieses Verhalten mitverantwortlich.

In verschiedenen anderen Lösungsmitteln gemessene CD-Spektren (Tab. 7) von 1 ergeben ein ähnliches Bild. Die Zuordnung des positiven Cotton-Effekts bei etwa 225 nm bis 230 nm zu einem Amidübergang wird durch seine Lösungsmittelabhängigkeit bestätigt. Der kurzwellige Cotton-Effekt erscheint zwischen 198 nm und 202 nm und hat dieselben Ursachen wie der entsprechende Cotton-Effekt in Cyclo-L-cystin. Für den Ursprung des langwelligen, schwach negativen Cotton-Effekts ist wahrscheinlich ein Disulfidübergang verantwortlich. CD-Spektren

Tab. 7: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von 1, 2 und 3

Lösungsmittel	Temperatur	1 λ(nm)	1 [θ]	2 λ(nm)	2 [θ]	3 λ(nm)	3 [θ] (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
Dioxan	20° C					313	21
						283	- 80
						228	17175
Äthanol (100%)	20° C					270	1115
		290	- 67	305	21	243	- 260
		229	13850	230	15040	226	7370
		202	- 79760	201	- 94140	201	- 84270
Methanol	20° C			325	14	272	1190
		286	- 170	285	- 125	240	- 2080
		228	13560	228	17110	225	3240
		201	- 85590	202	- 103980	201	- 83346
0,1 N HCl	20° C	290	- 40				
		227	10870	228	15185		
		200	- 71120	201	- 104365		
Trifluoräthanol	25° C			226	18325		
				200	- 97950		
CF_3-CO-CF_3 x 3 H_2O	25° C			224	19420		
				199	- 105830		

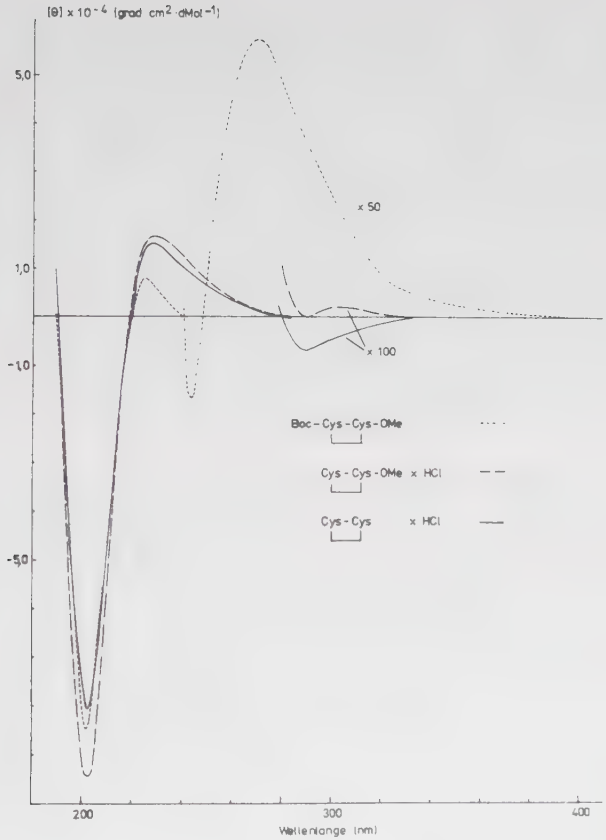


Abb. 22: CD-Spektren von 1, 2 und 3 in Äthanol (100%)

von 1 in 0,1 N HCl und in Methanol bei 20° C und 50° C zeigen nämlich, daß dieser Cotton-Effekt stark temperaturabhängig ist; in 0,1 N HCl wird er außerdem bei Temperaturerhöhung längerwellig verschoben. Die Abnahme der anderen beiden Cotton-Effekte ist dagegen nur gering. Die Annahme erscheint daher vernünftig, daß das schwach negative Maximum des längstwelligen Cotton-Effekts durch Überlappung eines Disulfidübergangs mit dem starken positiven Cotton-Effekt der Amidgruppe hervorgerufen wird. Durch diese Überlappung lassen sich sowohl das für eine Disulfidgruppe mit ähnlichem Torsionswinkel wie in L-Glutathion oder L-Cystin erstaunlich langwellige Maximum des Cotton-Effekts als auch dessen bathochrome Verschiebung bei Temperaturerhöhung erklären.

Ähnliche Verhältnisse werden auch bei den CD-Spektren von L-Cysteinyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid 2 gefunden; im kurzwelligen Teil sind die Spektren, von geringen Abweichungen der Elliptizitäten abgesehen, fast identisch mit den CD-Spektren von 1 (Tab. 7 und Abb. 22). Im langwelligen Bereich treten dagegen Unterschiede auf, die auf dem Einfluß der Estergruppierung beruhen. In den stark polaren Lösungsmitteln 0,1 N HCl, Trifluoräthanol und Hexafluoraceton-Trihydrat werden keine langwelligen Cotton-Effekte beobachtet; dies erinnert an Cyclo-L-cystin. In Methanol tritt bei 325 nm ein schwach positiver, bei etwa 285 nm ein stärkerer negativer Cotton-Effekt auf. Die Lage sowie die Temperaturabhängigkeit dieses zweiten Cotton-Effekts stimmen mit dem negativen Cotton-Effekt von 1 in Methanol überein. Es handelt sich also auch um ein durch Überlappung mit dem stark positiven Amid-Cotton-Effekt bathochrom verschobenes scheinbares CD-Maximum eines Disulfidüberganges. Dies wird dadurch bestätigt, daß das UV-Spektrum von 2 nur eine deutliche Schulter bei etwa 245 nm, also im Absorptionsbereich von Disulfiden mit Torsionswinkeln von ungefähr 90°, zeigt.

In Äthanol (100%) tritt im langwelligen Teil des CD-Spektrums des Dipeptidmethylesters 2 bei 305 nm ein schwacher positiver Cotton-Effekt auf, ein negativer bei 285 nm bis 290 nm ist nicht mehr zu finden. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei den CD-Spektren von L-Cystin-diäthylester-dihydrochlorid gemacht beim Übergang von Äthanol zu Propanol als Lösungsmittel. Konzentrations- oder elektrostatische Effekte als Ursache dieses Verhaltens konnten dabei ausgeschlossen werden [20]. Keinesfalls ist eine Voraussage der Helizität der Disulfidgruppen in 1 und 2 aus den CD-Spektren möglich, da die Elliptizitäten der Cotton-Effekte der Disulfidgruppe zu niedrig sind und somit durch Effekte der Umgebung zu stark beeinflußt werden können.

Die Einführung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe in 2 führt zum N- und C-terminal geschützten Dipeptid 3, das erhebliche Abweichungen von den CD-Spektren von 1 und 2 zeigt. In Äthanol (100%) (Abb. 22) tritt bei 270 nm ein positiver, bei 243 nm ein etwas schwächerer negativer Cotton-Effekt auf. Die Elliptizität des Amid-Cotton-Effekts bei 226 nm ist nur etwa halb so groß wie in 1 und 2, während der kurzwellige Cotton-Effekt eine ähnliche Elliptizität wie der entsprechende in 1 und 2 zeigt. Die beiden langwelligen Cotton-Effekte sind wahrscheinlich auf einen Disulfidübergang zurückzuführen. Ihre Lage ist symmetrisch zu 257 nm, was auf einen ähnlichen Torsionswinkel der Disulfidgruppe schließen läßt, wie ihn auch offenkettige Cystindisulfide besitzen. Diese Zuordnung der langwelligen CD-Banden wird durch die Beobachtung gestützt, daß beim Übergang von L-Cystin zu N,N'-Bismethyl-L-cystin in 0,1 N HCl ebenfalls zwei CD-Banden, eine längerwellige positive bei 280 nm und eine kürzerwellige negative bei 247 nm auftreten. Anscheinend genügt eine sukzessive Einführung von Substituenten an der Aminogruppe, um diesen Effekt verstärkt hervorzurufen. Allerdings unterscheiden sich

die beiden langwelligen Banden von 3 in ihrer Temperaturabhängigkeit. Interessanterweise tritt eine solche Bandenaufspaltung auch in reinen optisch aktiven Dialkyldisulfiden auf [20].

In dem unpolaren Lösungsmittel Dioxan ergibt sich ein wesentlich verschiedenes CD-Spektrum von 3 als in Methanol oder Äthanol (Tab. 7). Zwar sind die beiden langwelligen Banden mit entgegengesetzten Vorzeichen noch vorhanden, ihre Elliptizitäten sind jedoch beträchtlich verringert und ihr Maximum um etwa 40 nm bathochrom verschoben. Die Elliptizität der Amidbande in Dioxan hat sich gegenüber der in Äthanol verdoppelt, gegenüber der in Methanol sogar vervierfacht. Ähnliche Effekte wurden auch bei den Tripeptiden mit Disulfidbrücke beobachtet und werden dort (3.4.1.1.) ausführlich diskutiert.

3.3.5.2. IR- und Raman-Spektren von 1, 2 und 3

Von 1 und 3 wurden nur die IR-Spektren aufgenommen; die IR- und Raman-Spektren von 2 sind in Abb. 23 dargestellt. Im Bereich der Disulfidschwingungsbanden um 500 cm^{-1} treten im Raman-Spektrum von 2 zwei starke, etwa gleich intensive Linien bei 491 cm^{-1} und 516 cm^{-1} auf. Auch im IR-Spektrum treten zwei, allerdings schwache Banden bei 513 cm^{-1} und 526 cm^{-1} auf. Die CS-Schwingungen liegen bei höheren Frequenzen als bei Cyclo-L-cystin. Aus den cis-Amid-III-Banden bei 1334 bzw. 1335 cm^{-1} und 1304 bzw. 1305 cm^{-1} (im IR- bzw. Raman-Spektrum) erkennt man, daß es sich bei 2 um eine cis-Amidbindung handelt.[107]

Auch in den IR-Spektren von 1 und 3 treten jeweils zwei SS-Schwingungsbanden deutlich, jedoch erwartungsgemäß viel schwächer als im Raman-Spektrum von 2, auf: 1 zeigt zwei Banden bei 513 cm^{-1} und 526 cm^{-1}, also bei denselben Frequenzen wie in 2, 3 dagegen bei 500 cm^{-1} und 520 cm^{-1}. Auch die cis-Amid-III-Banden sind in den

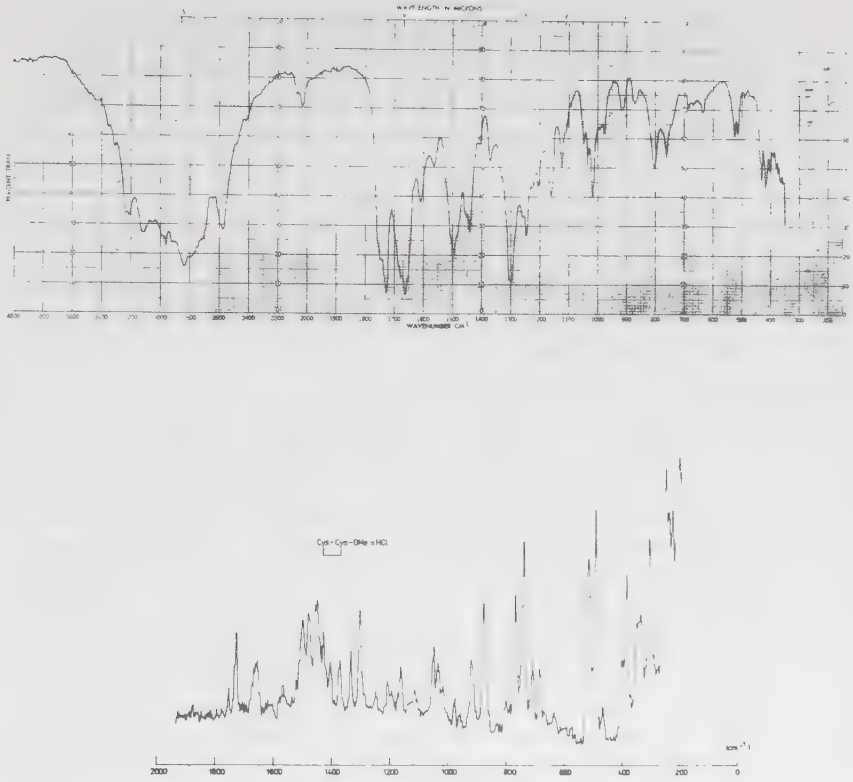


Abb. 23: IR- und Raman-Spektren von festem L-Cysteinyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid

IR-Spektren von 1 und 2 vorhanden. Daß jeweils zwei Banden bei der Disulfidschwingung auftreten, kann wieder auf dem Vorliegen mehrerer Konformerer im Kristall oder auf einer durch das Kristallgitter verursachten Aufspaltung beruhen.

3.4. Tripeptide mit Disulfidbrücken

Um den Einfluß der Disulfidgruppe auf den Circulardichroismus kleiner Peptide zu untersuchen, wurden die CD-Spektren einiger heterodetischer Tripeptide der allgemeinen Formel

Boc-Cys-[X]-Cys-OMe Cys-[X]-Cys-OMe x HCOOH

mit intramolekularen Disulfidbrücken gemessen. Eine solche Struktur kommt auch in der Natur in dem cyclischen Pentapeptid Malformin [20,108] vor. Bei Tripeptiden ist zwar die Ausbildung einer geordneten Struktur, z.B. einer Helix oder Faltblattstruktur nicht möglich, doch könnten die sterischen Gegebenheiten der Elf-Ringstruktur auch zur Kopplung der Amidchromophore führen. Die Lösungsmittel- und Temperaturabhängigkeit auf die CD-Spektren dieser Verbindungen wurden untersucht. Als Modellverbindung diente tert.-Butyloxycarbonyl-L-cysteinyl-alanyl-cystein-disulfid-methylester mit der einfachsten optisch aktiven Aminosäure zwischen N- und C-terminalem L-Cystein.

3.4.1. Boc-L-cysteinyl-alanyl-cystein-disulfid-methylester

Die CD-Spektren von Boc-L-cysteinyl-alanyl-cystein-disulfid-methylester 1 wurden im Bereich von 400 nm und 190 nm gemessen. In Äthanol (100 %) bei 20° C treten vier Banden auf: eine schwach negative Bande bei 300 nm, eine etwa doppelt so intensive positive Bande bei 260 nm, ein sehr intensiver negativer Cotton-Effekt bei 228 nm und ein

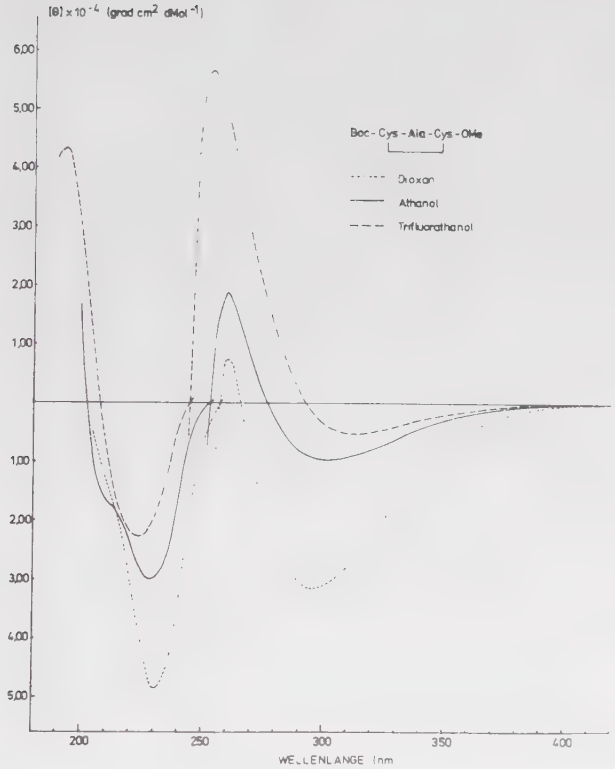


Abb. 24: CD-Spektren von Boc-Cys-Ala-Cys-OMe bei 20° C

etwa halb so intensiver negativer Cotton-Effekt bei 207 nm (Abb. 24). Einige Analogien zu den unter 3.3. diskutierten Verbindungen sind ersichtlich. Wie bei Cyclo-L-cystin und Boc-L-cysteinyl-cystein-disulfid-methylester tritt ein sehr langwelliger Cotton-Effekt um 300 nm auf, bei 1 allerdings mit wesentlich größerer Elliptizität und umgekehrtem Vorzeichen. Der Cotton-Effekt bei 260 nm entspricht den Cotton-Effekten der Disulfidgruppe in den S-Alkylthio-L-cysteinen und L-Glutathion. Auch dieser Cotton-Effekt besitzt in 1 das entgegengesetzte Vorzeichen wie in den genannten Verbindungen. Der Cotton-Effekt bei 228 nm tritt ebenfalls, mehr oder weniger stark verschoben, bei den vorher genannten Verbindungen auf. Gegenüber L-Glutathion ist sein Vorzeichen umgedreht und seine Elliptizität beträgt etwa das Fünffache, gegenüber Cyclo-L-cystin ist seine Elliptizität etwa halb so groß. Für den als Schulter bei 207 nm auftretenden Cotton-Effekt wurde jedoch keine analoge CD-Bande bei den bisher diskutierten Verbindungen gefunden.

3.4.1.1. Lösungsmittelabhängigkeit der CD-Spektren von 1

Zur Aufklärung der Ursachen der einzelnen Cotton-Effekte von 1 wurden die CD-Spektren in zehn verschiedenen Lösungsmitteln wachsender Polarität aufgenommen. Einen schematischen Überblick über die beobachteten Cotton-Effekte gibt Abb. 25. Einige Gesetzmäßigkeiten sind aus dieser Abbildung leicht zu erkennen. Die Zuordnung des intensiven negativen Cotton-Erfekts bei 228 nm in Äthanol zu einem Amidübergang wird durch die Verschiebung dieses Cotton-Effekts von 231 nm in Dioxan auf 222 nm in Hexafluoraceton-Trihydrat bestätigt. Es handelt sich um die den $n-\pi^*$-Übergängen gemeinsame hypsochrome Verschiebung beim Wechsel von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln [109]. Entsprechend wird für den Übergang bei 260 nm in Äthanol eine hypsochrome Verschiebung von 261 nm in Dioxan auf nm in Hexafluoraceton-Trihydrat beobachtet, ein Hin-

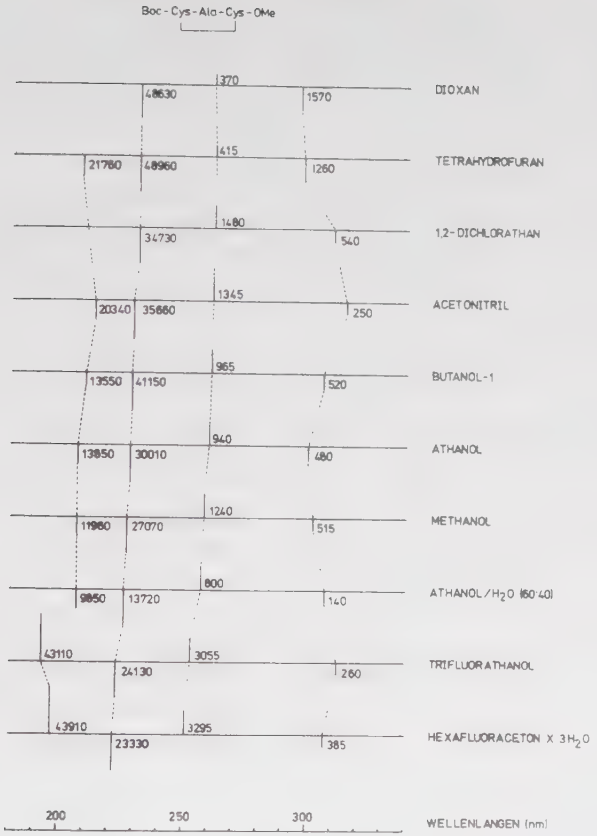


Abb. 25: Lösungsmittelabhängigkeit des Circulardichroismus von Boc-Cys-Ala-Cys-OMe bei 20° C
(Die Zahlen geben molare Elliptizitäten an)

weis auf die nichtbindende Natur des Orbitals, von dem aus der Elektronenübergang erfolgt. Die hypsochrome Verschiebung des Amid-Cotton-Effekts wird begleitet von einer Verminderung seiner Elliptizität. Ähnliche Abnahmen der Elliptizitäten beim Übergang von polaren zu unpolaren Lösungsmitteln wurden auch bei anderen Peptiden beobachtet [110,111]. Zur Erklärung der Abweichungen von dem ziemlich regelmäßigen Gang der Elliptizitäten bei Butanol-1 als Lösungsmittel muß vor allem die Viskosität der Lösung berücksichtigt werden. Durch die Erhöhung der Viskosität wird nämlich die Beweglichkeit der Molekülfragmente verringert und man erhält eine ähnliche Verstärkung der Cotton-Effekte wie bei einer Temperaturerniedrigung. Für den Disulfid-Cotton-Effekt wird, von dem Lösungsmittelgemisch Äthanol/Wasser (6:4, v/v) abgesehen, in der Reihe der Alkohole ebenfalls eine Abhängigkeit der Elliptizität von der Polarität beobachtet; dasselbe gilt in der Reihe der aprotischen Lösungsmittel.

Unerklärlich ist zunächst der langwellige Cotton-Effekt um 300 nm. In aprotischen Lösungsmitteln wird er mit steigender Polarität, im Gegensatz zum Disulfid-Cotton-Effekt bathochrom verschoben, wobei der Betrag seiner Elliptizität abnimmt; auch in den protischen alkoholischen Lösungsmitteln tritt eine langwellige Verschiebung auf, eine Abhängigkeit der Elliptizität von der Polarität ist jedoch nicht festzustellen. Eine solche bathochrome Verschiebung der Maxima der Cotton-Effekte ist charakteristisch für Übergänge, bei denen der angeregte Zustand polarer als der Grundzustand ist. Eine Erklärung dieses Cotton-Effekts ist möglich, wenn man annimmt, daß es sich um einen charge-transfer-Übergang handelt, wie er auch bei den Epidithiadiketopiperazinen gefunden wurde [100]. Im UV-Spektrum ist dieser Übergang ebenfalls als schwache Schulter zu sehen. Die in Trifluoräthanol und Hexafluoraceton-Trihydrat auftretenden positiven Cotton-Effekte im Bereich von 195 nm sind wohl wiederum auf eine Überlagerung eines

Disulfidübergangs und eines $\pi - \pi^*$-Übergangs der Amidgruppen zurückzuführen. Der Ursprung des als Schulter auftretenden negativen Cotton-Effekts bei etwa 210 nm ist ungeklärt; wahrscheinlich enthält er Anteile eines torsionswinkelunabhängigen Disulfidüberganges. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die räumliche Anordnung der Amidgruppen so ist, daß aufgrund ihrer Wechselwirkungen eine Aufspaltung des $\pi - \pi^*$-Überganges auftreten kann. Die Bande bei 210 nm wäre dann ebenfalls dem $\pi - \pi^*$-Übergang der Amidchromophore zuzuordnen [112].

3.4.1.3. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von 1

Die Temperaturabhängigkeit des Circulardichroismus von 1 wurde in Trifluoräthanol und Methanol gemessen. Tabelle 8 faßt die bei 0° C, 20° C und 40° C in Trifluoräthanol gemessenen Cotton-Effekte zusammen. Im langwelligen Bereich tritt praktisch keine Temperaturabhängigkeit auf, während im Bereich der Disulfidbande die Ellipitizität auf 81 % beim Übergang von 0° C auf 20° C und um weitere 18 % auf 63 % von 20° C auf 40° C linear abnimmt. Der Amid-Cotton-Effekt zeigt dagegen eine lineare Zunahme des Betrags seiner Ellipitizität um insgesamt 21 % im Temperaturintervall von 0° C bis 40° C. Man beobachtet außerdem eine Verschiebung des Maximums des Disulfid-Cotton-Effekts nach längeren Wellen mit steigender Temperatur; dies deutet darauf hin, daß mit steigender Temperatur eine Veränderung des Torsionswinkels der Disulfidgruppe auftritt. Die ausgeprägte Temperaturabhängigkeit dieses Cotton-Effekts hat also bei 1 zwei Ursachen; einmal ist sie durch die wachsende Population einer Disulfidkonformation mit verändertem Torsionswinkel bei höherer Temperatur und andererseits durch die übliche Diastereomerenumwandlung durch Rotation um die CS-SC-Gruppierung bedingt. Die gleichzeitige Zunahme der Ellptizität des Amid-Cotton-Effekts ist ein Hinweis darauf, daß die Änderung des Torsionswinkels mit einer starken Veränderung der Orientierung der Amidgruppe

relativ zur Disulfidgruppe verbunden ist.

Tabelle 8: Temperaturabhängigkeit der Cotton-Effekte von 1 in Trifluoräthanol

Temperatur	λ (nm)	$[\Theta]$ (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
0° C	312	- 295
	253	3890
	222	- 24200
20° C	312	- 295
	254	3105
	223	- 26790
40° C	312	- 295
	255	2440
	223	- 29390

Die CD-Spektren legen also nahe, daß 1 in Trifluoräthanol eine Disulfidgruppe mit einem den offenkettigen Cystindisulfiden vergleichbaren Torsionswinkel besitzt, der sich jedoch mit steigender Temperatur ändert. Um die langwellige Bande als charge-transfer-Bande deuten zu können und um die starken Auswirkungen der Änderung des Torsionswinkels der Disulfidgruppe auf den Amid-Cotton-Effekt zu erklären, muß weiter angenommen werden, daß eine relativ enge Nachbarschaft zwischen der Disulfidgruppe und einer der Amidgruppen des Elf-Rings besteht. Eine Voraussage der Helizität dieser Disulfidgruppe aus dem Vorzeichen ihres längstwelligen Cotton-Effekts kann aber nicht getroffen werden, solange Unklarheit über den Betrag des Torsionswinkels besteht. Die völlig entgegengesetzten Voraussagen über die Konformation der Disulfidbrücke in Malformin aus den CD-Spektren zeigen nämlich, daß die Kenntnis darüber, ob der Torsionswinkel kleiner oder größer als 90° ist, unerläßlich für die Festlegung der P- bzw. M-Helizität von Disulfiden ist [20,108].

Die Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von 1 in Methanol zeigt dagegen einen anderen Verlauf. Im Temperaturintervall von 0° C bis 40° C wird zwar ebenfalls eine lineare Abnahme der Elliptizität des langwelligen Cotton-Effekts der Disulfidgruppe beobachtet, aber auch der längstwellige negative Cotton-Effekt zeigt eine deutliche Temperaturabhängigkeit (Abb. 26). Im Gegensatz zu Trifluoräthanol ist in Methanol keine Abhängigkeit des Amid-Cotton-Effekts von der Temperatur festzustellen. Die mit steigender Temperatur eintretende Verschiebung des Disulfid-Cotton-Effekts nach längeren Wellenlängen ist ein Hinweis, daß auch in Methanol eine Änderung des Torsionswinkels der Disulfidgruppe eintritt; diese Änderung scheint aber den Amidübergang fast nicht zu beeinflussen. Diese unterschiedliche Temperaturabhängigkeit des Circulardichroismus von 1 in Trifluoräthanol und Methanol deutet darauf hin, daß in den beiden Lösungsmitteln verschiedene Konformationen von 1 vorliegen.

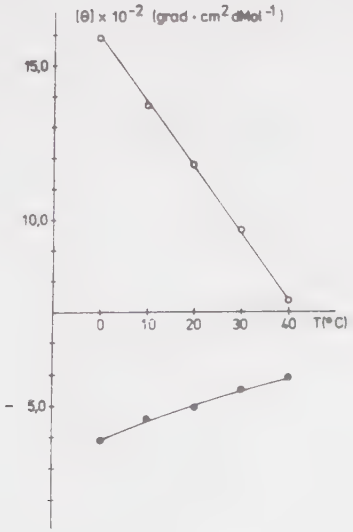


Abb. 26:
Temperaturabhängigkeit des Disulfid- und des längstwelligen negativen Cotton-Effekts von Boc-Cys-Ala-Cys-OMe in Methanol

3.4.2. Tripeptide der Struktur Boc-Cys-(X)-Cys-OMe

Bei Untersuchungen der Konformation von Polyaminosäuren oder Proteinen mittels chiroptischer Methoden werden meist nur die Beiträge des "backbone"-Gerüsts zu den Cotton-Effekten berücksichtigt, während die Seitenkettenbeiträge vernachlässigt werden [113]. Bei diesen Makromolekülen ist eine solche Vereinfachung zulässig, da erwiesen ist, daß hauptsächlich die "backbone"-Konformation für die Lage und Intensitäten der Cotton-Effekte verantwortlich ist; die Nichtbeachtung der Seitenkettenbeiträge führt dennoch oft genug zu Fehlern bei der Bestimmung des Gehalts an geordneten Strukturen. Erst recht müssen bei der Untersuchung kleiner Peptide die Einflüsse der Seitenketten berücksichtigt werden. Daher wurden die Tripeptide obiger Struktur mit X = L-Alanin 1, L-Valin 2, L-Leucin 3, L-Phenylalanin 6, L-Glutaminsäure-γ-tert.-butylester 4 und ε-Benzyloxycarbonyl-L-Lysin 5 mit Hilfe des Circulardichroismus untersucht und die Gemeinsamkeiten und Verschiedenheiten ihrer CD-Spektren ermittelt.

3.4.2.1. CD-Spektren der Verbindungen 1 bis 6

Qualitativ sehen sich die CD-Spektren von 1 bis 6, mit Ausnahme von 2, sehr ähnlich. Abb. 27 zeigt die CD-Spektren von 1, 3 und 6 in Trifluoräthanol bei 20° C; die Cotton-Effekt-Parameter von 1 bis 6 in Dioxan und Trifluoräthanol bei 20° C sind in Tabelle 9a und 9b zusammengestellt. In Dioxan tritt bei etwa 232 nm ein starker negativer Cotton-Effektauf, der sicher dem Amidübergang entspricht; die Elliptizitäten dieses Cotton-Effekts liegen für 1, 4 und 6 um - 50000 grad cm^2 $dMol^{-1}$, was als Hinweis darauf gewertet werden kann, daß bei diesen Verbindungen die Konformation des die Disulfidgruppe enthaltenden Rings sehr ähnlich ist. Dies wird dadurch bestätigt, daß die entsprechenden Cotton-Effekte bei 222 nm bis 223 nm in Trifluoräthanol bei 1, 3 und 4 ebenfalls ähnliche

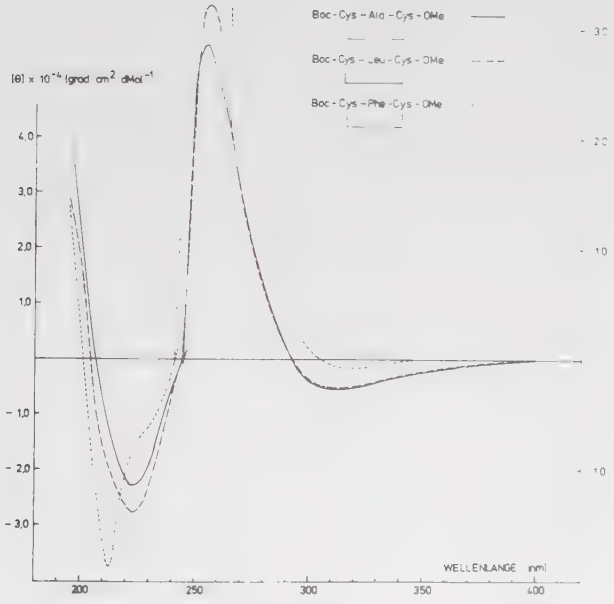


Abb. 27: CD-Spektren von 1, 3 und 6 in Trifluoräthanol bei 20° C

Tab. 9a: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von Tripeptiden der Struktur

Boc-Cys-[X]-Cys-OMe

bei 20° C in Dioxan

Verbindung	λ(nm)	[Θ] (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
X = L-Alanin	296	- 1570
1	261	370
	231	- 48630
X = L-Valin	280	- 630
2	261	- 425
	235	- 10280
X = L-Glutaminsäure-	300	- 1235
-tert.-butylester	262	820
4	232	- 51300
	211,5	- 18935
X = L-Phenylalanin	303	- 1240
6	269	350
	263	905
	259,5	845
	231,5	- 50520
	218	- 34445

Tab. 9b: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von Tripeptiden der Struktur

Boc-Cys-[X]-Cys-OMe

bei 20° C in Trifluoräthanol

Verbindung	λ(nm)	[θ] (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
X = L-Alanin	312	- 260
1	253	3055
	223	- 24130
	193	43110
X = L-Valin	271	- 640
2	250	- 85
	233	- 2445
	222,5	- 385
X = L-Leucin	313	- 255
3	254	2860
	223	- 27555
	210	- 16745
	195	28825
X = L-Glutaminsäure-	313	- 255
-tert.-butylester	254	3150
4	221,5	- 26440
X = -Benzyloxycarbo-	310	- 315
nyl-L-Lysin	253,5	2810
5	223,5	- 7225
	219	- 6880
X = L-Phenylalanin	317	- 80
6	268	2590
	262	3480
	253	4150
	227	- 13700
	213,5	- 35225

molare Elliptizitätswerte (- 25000 grad cm^2 $dMol^{-1}$) besitzen. Die Abweichungen von 5 und 6 in Trifluoräthanol können durch die starke Überlappung der beiden negativen Cotton-Effekte erklärt werden.

In ähnlicher Weise entsprechen sich die längstwelligen Cotton-Effekte von 1, 4 und 6 in Dioxan bzw. von 1, 3, 4 und 5 in Trifluoräthanol in ihrer ungefähren Lage und Elliptizität. Auch für die Disulfid-Cotton-Effekte bei etwa 254 nm von 1, 3, 4 und 5 in Trifluoräthanol werden molare Elliptizitäten derselben Größenordnung gefunden. Man kann also sagen, daß zumindest bei den Tripeptiden mit X = L-Ala, L-Leu, L-Glu(OtBu) und L-Lys(Z) in Trifluoräthanol die Konformation des cyclischen Disulfidgerüsts gleich und bestimmend für den langwelligen Cotton-Effekt, den Disulfid-Cotton-Effekt und den Amid-Cotton-Effekt ist. Der Einfluß der Seitenketten bei diesen Tripeptiden äußert sich in Trifluoräthanol im mehr oder weniger starken Auftreten einer Schulter im Bereich von 210 nm bis 220 nm und in der Elliptizität des kurzwelligen Cotton-Effekts bei etwa 195 nm, die jedoch nur bei 1 und 3 mit einiger Genauigkeit bestimmt werden konnte. Diese Ähnlichkeit der Konformation des Disulfidrings ist nicht überraschend, da bei 1, 3, 4 und 5 die unmittelbare Umgebung dieses Rings identisch ist. Die bei 6 auftretenden Abweichungen müssen auf die Anwesenheit des aromatischen Rings zurückgeführt werden. Ob diese Abweichungen durch eine gegenüber den vorigen Peptiden veränderte Konformation (z.B. Wechselwirkungen zwischen dem Aromaten und den Amidbindungen des Disulfidrings) oder nur durch die Störung des $n \rightarrow \pi^*$-Übergangs der Peptidbindung zwischen Phenylalanin und Cystein durch den aromatischen Rest verursacht werden, läßt sich nicht eindeutig aus diesen Messungen entscheiden. Die zweite Annahme kann aber als die wahrscheinlichere betrachtet werden, da in der Lage der Cotton-Effekte von 6 kaum Abweichungen von den Cotton-Effekten der übrigen Tripeptide dieser Struktur vorkommen.

Aus all diesen Befunden ergibt sich, daß bei den obigen Tripeptiden die gleiche Konformation der relativ starren Ringstruktur vorliegt. Das völlig abweichende CD-Spektrum von 2 ist nicht zu erklären; dies ist überraschend, da nach Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-schutzgruppe ein ähnliches CD-Spektrum von 2 erhalten wird wie bei den anderen Tripeptiden mit abgespaltener Schutzgruppe (3.4.3.).

3.4.2.2. IR-Spektren der Verbindungen 1 bis 6

In Abb. 28 sind die IR-Spektren von 1, 4 und 6 im festen Zustand dargestellt. Im Bereich der SS-Valenzschwingungsfrequenz treten bei 1 und 6 zwei oder drei schwache bis sehr schwache Banden auf, während bei den übrigen Verbindungen keine Banden in diesem Bereich zu erkennen sind. Dagegen treten die CS-Schwingungen bei allen Verbindungen mit mittlerer Intensität auf, ihre Frequenz entspricht der anderer Cystinpeptide. Die bei höheren Frequenzen auftretenden stärkeren Banden sind in Tabelle 10 aufgeführt und versuchsweise zugeordnet. Aus der stark ausgeprägten trans-Amid-II-Bande bei etwa 1520 cm^{-1} bis 1540 cm^{-1} und dem Fehlen von Banden bei 1300 cm^{-1} und 1345 cm^{-1} (cis-Amid-III-Bande) darf man schließen, daß zumindest im festen Zustand die Tripeptide trans-Amidbindungen besitzen [107]. Daraus sollte jedoch nicht abgeleitet werden, daß auch in Lösung nur trans-Amidbindungen vorliegen, da selbst bei größeren cyclischen Peptiden noch cis-Amidbindungen in Lösung nachgewiesen werden konnten [114].

3.4.3. Tripeptide der Struktur Cys-(X)-Cys-OMe x HCCOH

Schon bei L-Cystin haben Veränderungen der Aminogruppen durch Methylierung oder Acetylierung starke Änderungen der CD-Spektren zur Folge [20,32]. Durch Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe von den Verbindungen 1 bis 6 erhält man Tripeptide mit Disulfidring, bei denen eine

Tab. 10: Schwingungsfrequenzen (cm^{-1}) von Tripeptiden des Typs Boc-Cys-[X]-Cys-OMe

Verbindung	1	2	3	4	5	6	Zuordnung
	495		500				
	516					514	
	531					529	SS stretch
	651	655	653	654	655	653	
			668	670			CS stretch
	691				693	699	
						749	Aromat CH out of plane
	1160		1160	1160		1158	CO Ester stretch
	1170	1170	1175		1168	1168	
	1258	1250	1259	1250	1260		trans Amid III
	1440	1440	1440		1440		CH_2 deformation
	1529	1520	1521	1519	1502	1520	Amid II
	1541		1540	1530	1540	1540	
	1652	1655	1654	1660	1640	1651	Amid I
	1680	1678	1681	1673	1677	1680	
	1690	1696		1690	1690		C=O Urethan stretch
				1729			C=O tert.-Butylester stretch
	1741	1741	1747	1742	1731	1741	C=O Methylester stretch
						3025	CH stretch (Aromat)
	3305		3290	3295		3298	NH stretch
	3340	3360	3335	3340	3345	3330	

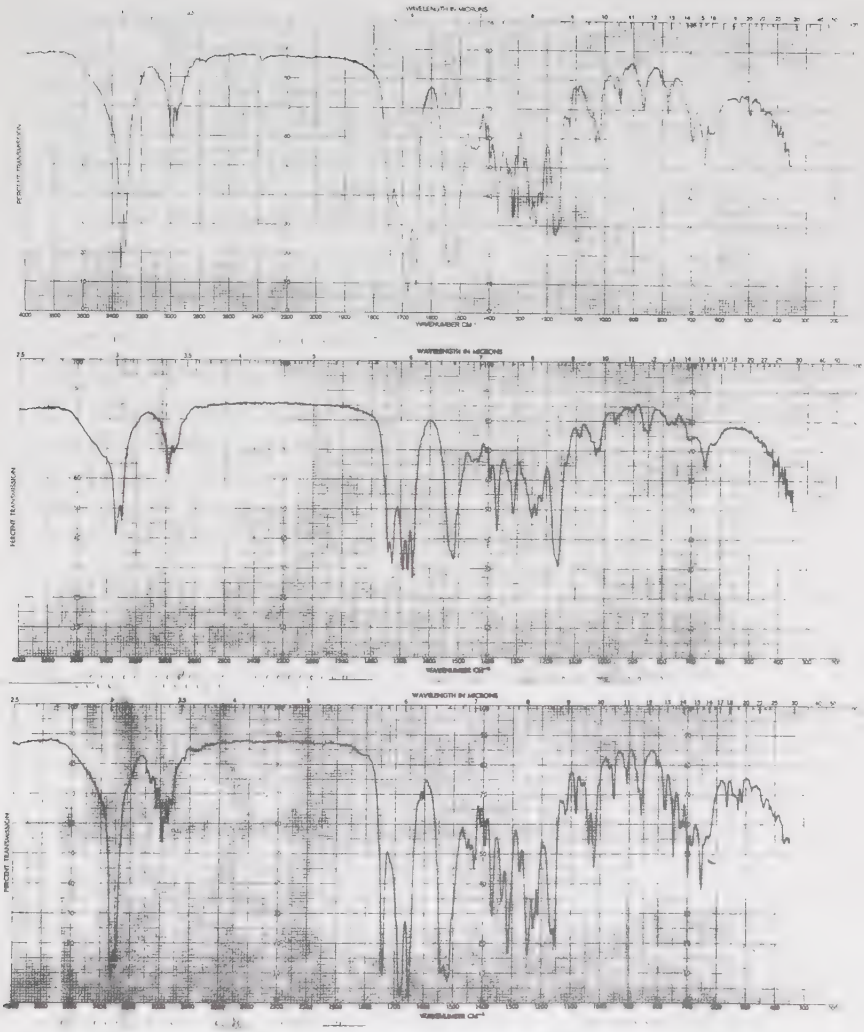


Abb. 28: IR-Spektren von festem Boc-$\overline{\text{Cys-Ala-Cys}}$-OMe,
Boc-$\overline{\text{Cys-Glu}(\gamma\text{OBut})\text{-Cys}}$-OMe und Boc-$\overline{\text{Cys-Phe-Cys}}$-OMe

Aminogruppe frei und die andere in einer Peptidbindung gebunden vorliegt. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Entfernung der voluminösen tert.-Butyloxycarbonylgruppe auf die Konformation der Ringstruktur dieser Tripeptide besitzt; außerdem sollte ermittelt werden, ob und wieweit bei diesen Verbindungen die Konformation des Disulfidrings durch die Seitenkette beeinflußt wird.

3.4.3.1. CD-Spektren der Tripeptide mit abgespaltenem tert.-Butyloxycarbonylrest

Die CD-Spektren der Tripeptide Cys-(X)-Cys-OMe x HCOOH mit X = L-Alanin 1a, L-Valin 2a, L-Leucin 3a, L-Glutaminsäure 4a, ε-Benzyloxycarbonyl-L-lysin 5a und L-Phenylalanin 6a wurden in Trifluoräthanol bei 20° C im Bereich von 400 nm bis 195 nm gemessen. Die Lage und molaren Elliptizitäten der Cotton-Effekte sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Auffallend ist zunächst die starke Streuung der Lage und Elliptizitäten des längstwelligen Cotton-Effekts von 1a bis 6a. Man kann dabei eine Gesetzmäßigkeit erkennen, die zeigt, daß das Maximum dieser langwelligen Cotton-Effekte nur ein scheinbares Maximum ist. Es zeigt sich nämlich, daß die molaren Elliptizitäten um so niedriger sind, je längerwellig das betreffende Maximum liegt. Ein solcher Zusammenhang ist dann zu erwarten, wenn ein relativ schwacher Cotton-Effekt von einem starken Cotton-Effekt mit entgegengesetztem Vorzeichen überlagert wird [115]. Dadurch werden die Maxima beider Cotton-Effekte scheinbar auseinandergerückt, wobei der schwächere Cotton-Effekt eine wesentlich größere Verschiebung erfährt als der stärkere. Es kann also sicher angenommen werden, daß der für dieses langwellige Maximum verantwortliche Übergang energetisch oberhalb von 308 nm, dem kürzestwelligen Maximum dieses Cotton-Effekts, das bei diesen Verbindungen beobachtet wird, liegt.

Tab. 11: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von Tripeptiden der Struktur Cys-[X]-Cys-OMe × HCOOH

bei 20° C in Trifluoräthanol

Verbindung	λ(nm)	[θ] (grad cm^2 dMol^{-1})
X = L-Alanin	313	- 155
1a	255,5	1070
	226,5	- 22825
	210	- 6630
X = L-Valin	345,5	- 55
2a	268,5	530
	226	- 37980
X = L-Leucin	332	- 95
3a	258,5	1135
	227	- 37680
	207,5	- 5825
X = L-Glutaminsäure	311	- 220
4a	256	1570
	225	- 27360
X = -Benzyloxycarbo-	308	- 365
nyl-L-Lysin	255,5	1265
5a	225,5	- 31655
X = L-Phenylalanin	315	- 210
6a	267,5	1260
	262	1630
	256	1835
	227,5	- 24290
	214	- 28400

Die Disulfid-Cotton-Effekte liegen, mit Ausnahme von 2a, im Bereich zwischen 255,5 nm und 258,5 nm und weisen vergleichbare molare Elliptizitäten auf. Lage und Elliptizitäten dieses Cotton-Effekts deuten wieder auf ähnliche Torsionswinkel der Disulfidgruppe wie in offenkettigen Cystindisulfidderivaten hin. Alle Verbindungen besitzen im Bereich der Amidabsorption einen starken negativen Cotton-Effekt, dessen Elliptizität zwischen - 22825 grad cm^2 $dMol^{-1}$ bei 1a und - 37980 grad cm^2 $dMol^{-1}$ bei 2a liegt. Eine Schulter bei kürzeren Wellenlängen als 215 nm tritt bei 1a, 3a und 6a auf.

Auch in dieser Reihe nimmt die Verbindung mit X = L-Valin 2a eine Sonderstellung ein. Außer dem sehr stark bathochrom verschobenen langwelligen Cotton-Effekt bei 345,5 nm tritt ein ebenfalls stark bathochrom verschobener Disulfid-Cotton-Effekt bei 268,5 nm auf. Der Amid-Cotton-Effekt liegt dagegen in einem den übrigen Verbindungen vergleichbaren Bereich, seine Elliptizität ist allerdings wesentlich höher als die der meisten anderen Tripeptide; nur bei 3a findet man einen ähnlich hohen Betrag.

Eine klare Beziehung zwischen der Art der Seitenkette und den molaren Elliptizitäten der Cotton-Effekte läßt sich nicht herstellen. Es scheint jedoch, daß verzweigte Seitenketten, wie in L-Valin oder L-Leucin, geringere Elliptizitäten der beiden langwelligen Cotton-Effekte zur Folge haben als unverzweigte; für den Amid-Cotton-Effekt gilt das Umgekehrte. Insgesamt ist eine starke Abhängigkeit des CD-Spektrums von der Art des Aminosäurerests festzustellen. Die starken Unterschiede in der Lage der langwelligen Cotton-Effekte und in der Elliptizität des Amid-Cotton-Effekts deuten darauf hin, daß außer der unterschiedlichen Störung durch die Seitenkette auch geringe Unterschiede in der Konformation der Disulfidringstruktur für diese Abhängigkeit der CD-Spektren verantwortlich sind.

3.4.3.2. Vergleich der Tripeptide 1 bis 6 mit den Tripeptiden 1a bis 6a

Der wesentliche Unterschied zwischen den CD-Spektren von 1 bis 6 und denen von 1a bis 6a (die L-Valin enthaltenden Tripeptide 2 und 2a lassen sich nur schwer miteinander vergleichen) besteht darin, daß bei den geschützten Tripeptiden nur geringe Differenzen zwischen den Verbindungen mit verschiedner Seitenkette auftreten. Das bedeutet, daß bei diesen Tripeptiden die Konformation des heterodetischen Rings und seiner Umgebung ziemlich unabhängig von der Art der Seitenkette ist. In der Verbindungsreihe 1a bis 6a ermöglicht das Fehlen der voluminösen Schutzgruppe anscheinend auch dem Disulfidring ein größeres Maß an konformativer Beweglichkeit, sodaß der Einfluß der verschiedenen Aminosäurereste sich stärker auswirken kann.

Erstaunlich ist die für Disulfide in Trifluoräthanol relativ langwellige Lage des Disulfid-Cotton-Effekts in der Reihe der ungeschützten Verbindungen. Gegenüber den durch die tert.-Butyloxycarbonylgruppe geschützten Tripeptiden liegt das Maximum dieses Cotton-Effekts um durchschnittlich 2,8 nm bei längeren Wellen. Entsprechend ist auch das Maximum des Amid-Cotton-Effekts bathochrom verschoben; außer bei 6 und 6a tritt eine deutliche Verschiebung um bis zu 4 nm beim Übergang vom geschützten zum ungeschützten Tripeptid auf. Für den Disulfid-Cotton-Effekt stimmt die längerwellige Lage des Maximums in den Verbindungen mit protonierter Aminogruppe gegenüber denen mit geschützter Aminogruppe mit den Befunden an L-Glutathion (3.2.2.) überein. Die bathochrome Verschiebung des Amid-Cotton-Effekts läßt sich vielleicht durch eine in den ungeschützten Peptiden stärkere Abschirmung der Peptidbindungen gegen das Lösungsmittel erklären, wie sie auch zur Deutung des langwelligen Maximums des Amid-Cotton-Effekts von Cyclo-L-cystin vorgeschlagen worden ist [22].

Vergleicht man die molaren Elliptizitäten der Disulfid-Cotton-Effekte (Tab. 9 und Tab. 11), so erkennt man, daß bei den geschützten Tripeptiden zwei-bis dreimal so hohe Beträge auftreten. Dies ist in voller Übereinstimmmung damit, daß die Einführung von Substituenten an der Aminogruppe von L-Cystinderivaten zu einer Vergrößerung der positiven Elliptizität des Disulfid-Cotton-Effekts führen kann [20]. Wahrscheinlich ist dieser Effekt nicht auf eine Änderung der Helizität der Disulfidgruppe zurückzuführen, sondern eher darauf, daß eine Verschiebung des Verhältnisses der Rotameren g, h und t (3.2.1.) auftritt. Diese Verschiebung führt zu einer wachsenden Population der Rotameren g und h mit steigender Größe des Substituenten an der Aminogruppe, während der Anteil des bei L-Cystin stabilsten Konformeren t abnimmt. Offensichtlich ergibt das Rotamere t einen stark negativen Beitrag zur Elliptizität des Disulfid-Cotton-Effekts, während die Rotameren g und h einen weniger negativen oder sogar positiven Beitrag liefern.

Um Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der Konformation des heterodetischen Disulfidrings in den geschützten bzw. ungeschützten Tripeptiden feststellen zu können, ist es auch möglich, die Amid-Cotton-Effekte miteinander zu vergleichen. Zunächst ist nur eine Ähnlichkeit der molaren Elliptizitäten der Amid-Cotton-Effekte von 1 und 1a sowie von 4 und 4a zu sehen. Addiert man jedoch die Elliptizitäten der beiden negativen Cotton-Effekte im kurzwelligen Teil des CD-Spektrums von 3 und 6 sowie von 3a und 6a und vergleicht die Summen miteinander, so sieht man, daß sich Werte in derselben Größenordnung ergeben. Nur bei 5 und 5a sind wesentliche Unterschiede zu beobachten. Dies zeigt, daß trotz der Verschiedenheit der Elliptizitäten der Amid-Cotton-Effekte innerhalb der beiden Reihen 1 bis 6 bzw. 1a bis 6a der Unterschied zwischen der Ringkonformation des geschützten und des ungeschützten Peptids nur klein sein kann.

3.5. Verbindungen des Typs Boc-Cys-[Gly]$_x$-Cys-OMe

Heterodetische cyclische Tripeptide mit Disulfidbrücken kommen in der Natur nur selten vor. Dagegen sind cyclische Peptide mit Disulfidbrücken, die mehr als eine Aminosäure zwischen N- und C-terminalem L-Cystein enthalten, recht häufig vertreten. So besteht z.B. der intrachenare Disulfidring des Insulins aus insgesamt sechs Aminosäuren -Cys-Cys-Ala-Gly-Val-Cys-, ebenso liegen bei den Peptidhormonen Oxytocin und Vasopressin heterodetische cyclische Hexapeptide vor. Um den Einfluß der Disulfidgruppe auf die chiroptischen Eigenschaften solcher Peptide abschätzen zu können, wurden Peptide des Typs

Cys-[Gly]$_x$-Cys Boc-Cys-[Gly]$_x$-Cys-OMe

mit Disulfidbrücken bzw. deren geschützte Derivate untersucht. Die optisch inaktive Aminosäure Glycin wurde gewählt, da sie keinen intrinsischen Beitrag zur optischen Aktivität des Peptids leisten kann. Die beobachtete optische Aktivität dieser Peptide ist also nur durch die Beiträge der C_α-Atome der beiden L-Cysteinreste, der Disulfidbrücke und der Konformation des heterodetischen Rings zu erklären.

3.5.1. Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von Boc-Cys-Gly-Cys-OMe

Die CD-Spektren von Boc-Cys-Gly-Cys-OMe 1 bei 20° C und 45° C in Trifluoräthanol, sowie bei 20° C in Dioxan sind in Abb. 29 dargestellt. Erwartungsgemäß zeigen sich einige Analogien zu den CD-Spektren der in 3.4.2. diskutierten Tripeptide. Auffallend ist jedoch, daß die molare Elliptizität des längstwelligen Cotton-Effekts von 1 bei etwa 305 nm bzw. 315 nm geringere Werte aufweist, während die molare Elliptizität des Disulfid-Cotton-Effekts wesentlich größer ist als bei den Tripeptiden, die optisch aktive Aminosäuren in Position 2 enthalten (Tab. 12 und

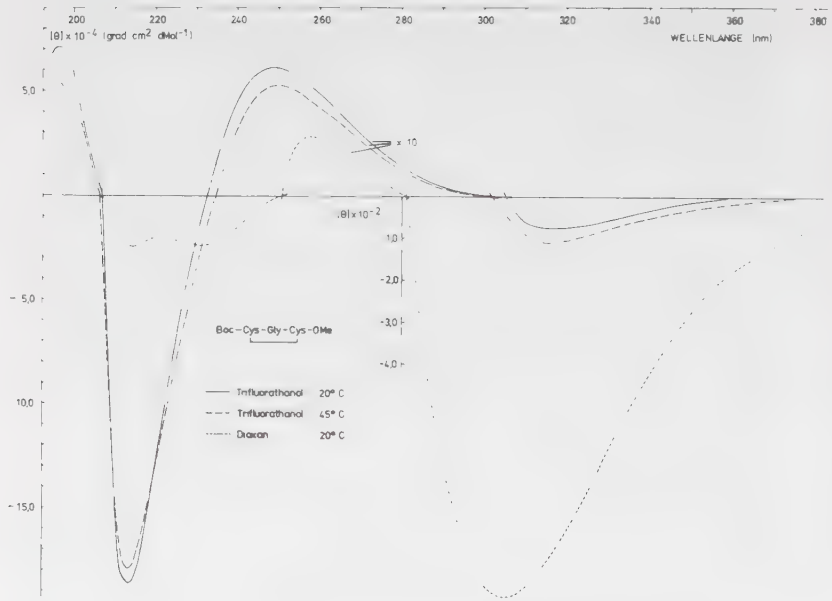


Abb. 29: CD-Spektren von Boc-Cys-Gly-Cys-OMe

Tab. 9a,b). Das Maximum des Disulfid-Cotton-Effekts ist außerdem um etwa 5 nm hypsochrom gegenüber den anderen Tripeptiden verschoben. Auch der Amid-Cotton-Effekt zeigt eine solche hypsochrome Verschiebung: er liegt bei ungefähr derselben Wellenlänge, wie die in den Tripeptiden in 3.4.2. auftretenden Schultern. Nur in Dioxan ist auch bei 230 nm ein Cotton-Effekt zu beobachten. Bei 45° C hat die Elliptizität des längstwelligen Cotton-Effekts einen größeren, die des Disulfid-Cotton-Effekts einen kleineren Wert als bei 20° C; die prozentuale Änderung der beiden Cotton-Effekte ist aber unterschiedlich. Auch der kurzwellige Cotton-Effekt nimmt deutlich ab, während der Amid-Cotton-Effekt bei 213 nm nur eine ganz geringe Temperaturabhängigkeit zeigt.

Tab. 12: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von Boc-L-Cys-Gly-Cys-OMe 1

Lösungsmittel	Temperatur	λ(nm)	[Θ] (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
Dioxan	20° C	305	- 960
		258	2750
		230	- 23560
		214	- 22600
Trifluoräthanol	20° C	317	- 75
		248	6015
		213	- 17390
		197	69160
	45° C	315	- 105
		250	5325
		213	- 17700
		196	57175

Anscheinend ist also der Beitrag optisch aktiver L-Aminosäuren in Position 2 zum Circulardichroismus von Tripeptiden der Struktur Boc-L-Cys-(X)-Cys-OMe im Bereich

der Disulfidabsorption bei etwa 250 nm negativ. Wenn auch die Zu- bzw. Abnahme der Elliptizitäten der Cotton-Effekte von 1 nicht so ausgeprägt ist wie bei den S-Alkylthio-L-cysteinen (3.1.2.) oder bei oxidiertem L-Glutathion 3.2.1.), muß die beobachtete Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren von 1 doch auf eine Konformationsänderung zurückzuführen sein. Diese Konformationsänderung betrifft vor allem die Disulfidgruppierung, worauf auch die Verschiebungen der Maxima der beiden längstwelligen Cotton-Effekte hinweisen. Einen unabhängigen Beweis für eine solche Konformationsumwandlung liefert die nun zu diskutierende Zeitabhängigkeit des CD-Spektrums von 1.

3.5.2. Zeitabhängigkeit des CD-Spektrums von 1

Bei der Aufnahme des CD-Spektrums von 1 in Äthanol (96 %) bei 20° C wurde ein zunächst überraschender Effekt beobachtet: Während der zweimaligen Registrierung des Spektrums über einen Bereich von 400 nm bis 200 nm trat eine Hypsochromie des längstwelligen Cotton-Effekts und gleichzeitig eine Vergrößerung seiner negativen Elliptizität auf; außerdem wurde eine Hypochromie des Disulfid-Cotton-Effekts und eine Hyperchromie des Cotton-Effekts bei 224 nm beobachtet. Um diese Effekte quantitativ verfolgen zu können, wurde das CD-Spektrum von 1 im Bereich von 400 nm bis 250 nm in Abständen von 5, 30, 60, 100, 150 und 230 Minuten nach Herstellung der Lösung, und im Bereich von 280 nm bis 200 nm nach 25, 55, 85, 125 und 175 Minuten registriert. Die beobachteten CD-Spektren sind in Abb. 30 dargestellt. Außerdem wurde das UV-Spektrum von 1 nach 5 Minuten und nach 240 Minuten gemessen, wobei sich kein Unterschied ergab.

Die beobachtete Zeitabhängigkeit ist also nicht auf eine Zersetzung der Verbindung, sondern sicher auf eine Konformationsumwandlung zurückzuführen. Wie bei der Temperaturabhängigkeit des Circulardichroismus von 1 in Trifluoräthanol wird eine hypsochrome Verschiebung und Zu-

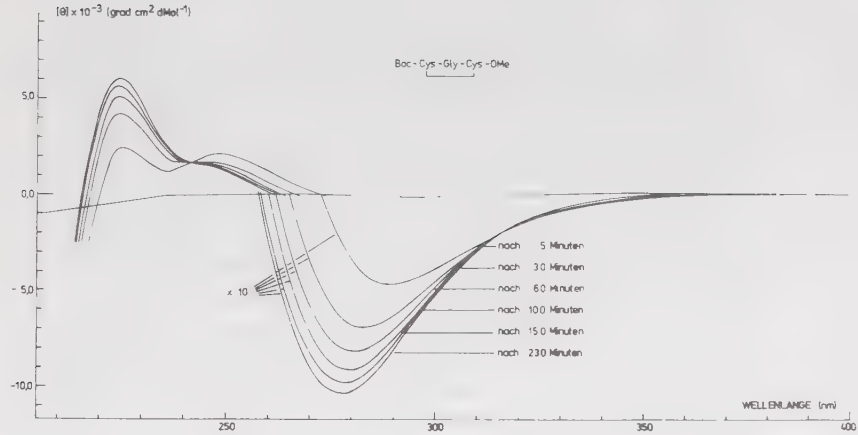


Abb. 30: Zeitabhängigkeit des CD-Spektrums von Boc-Cys-Gly-Cys-OMe in Äthanol (96%)

nahme des längstwelligen Cotton-Effekts beobachtet, während die Elliptizität des Disulfid-Cotton-Effekts zwar abnimmt, sein Maximum jedoch bei ungefähr der gleichen Wellenlänge bleibt. Auch die Lage des Cotton-Effekts bei 224 nm bleibt gleich; erstaunlich ist die gegenüber der Temperaturabhängigkeit in Trifluoräthanol starke Zunahme der molaren Elliptizität dieses Cotton-Effekts.

Zur Deutung der Konformationsumwandlung von 1 beim Übergang vom Kristall zur Lösung müssen verschiedene Prozesse betrachtet werden. Zum einen ist eine Torsion der Disulfidgruppe möglich, zum andren könnten cis/trans-Isomerisierungen sowohl der beiden Peptidbindungen des heterodetischen Rings als auch der Urethanbindung auftreten. Diese verschiedenen Prozesse könnten, da sie ähnliche Energiebarrieren besitzen, gleichzeitig oder einzeln nacheinander mit vergleichbarer Geschwindigkeit ablaufen. Um zu entscheiden, ob die beobachtete Zeitabhängigkeit des Circulardichroismus von 1 auf nur einen oder mehrere dieser Prozesse zurückzuführen ist, wurde eine spektroskopisch-kinetische Analyse durchgeführt.

Schon das Auftreten zweier Punkte gleicher Elliptizität (entsprechend isosbestischen Punkten in der UV-Spektroskopie) bei etwa 316 nm und 241 nm läßt vermuten, daß ein einheitlicher Vorgang für diese Kinetik verantwortlich ist. Diese Vermutung wird bekräftigt, wenn man die Elliptizitäts-Zeit-Meßwerte $[\Theta]$ (t) bei jeweils zwei verschiedenen Wellenlängen gegeneinander aufträgt. Bei einer einheitlichen Reaktion müssen diese Diagramme Geraden ergeben, was auch gefunden wurde (Abb. 31). Modellbetrachtungen von 1 zeigen aber, daß eine völlig unabhängige Isomerisierung der Disulfidgruppe oder der Peptidbindungen nicht möglich ist, sondern daß eine solche Isomerisierung den ganzen heterodetischen Ring mitbeeinflußt; die außen am Ring befindlichen Gruppen müssen dabei jedoch nicht bewegt werden. Verlaufen nun alle Isomerisierungsprozesse

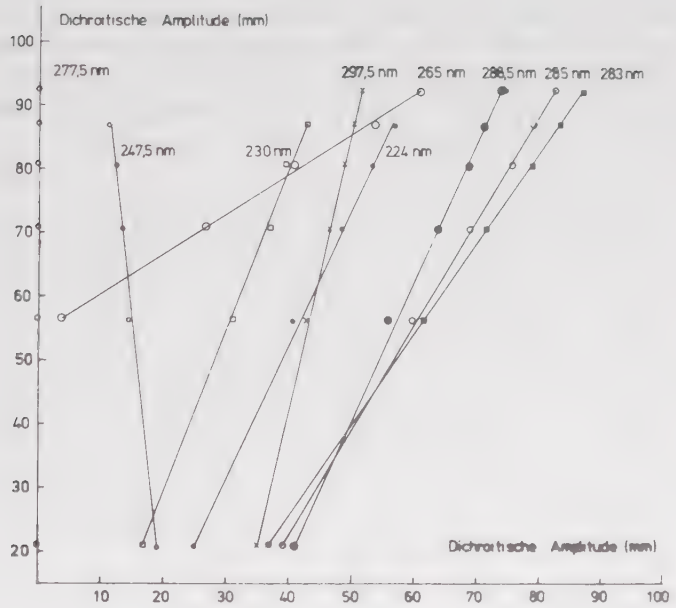


Abb. 31: Elliptizitäts-Zeit-Kurven von Boc-Cys-Gly-Cys-Le

innerhalb des Disulfidrings synchron oder mit strenger mechanischer Kopplung mit der Torsion der CSSC-Gruppierung, ist eine Zeitabhängigkeit wie die beobachtete ebenfalls möglich; auf keinen Fall aber können Torsion und Isomerisierung als Folgereaktion betrachtet werden [116-119]. Die Vermutung wird also bestätigt, daß in 1 beim Übergang vom Kristall in die Lösung eine Torsion der Disulfidgruppe, begleitet von Konformationsänderungen des gesamten heterodetischen Rings auftritt. Die immer mögliche E/Z-Isomerisierung der Urethanbindung scheint jedoch keine Rolle zu spielen.

Diese Konformationsumwandlung der Tripeptide beim Übergang vom Kristall in die Lösung ist wahrscheinlich nicht auf Glycin in Position 2 beschränkt. Bei den Verbindungen mit optisch aktiver Aminosäure in Position 2 wurde aber keine derartige Zeitabhängigkeit des Circulardichroismus beobachtet; nur bei Boc-L-cysteinyl-alanyl-cysteindisulfid-methylester waren nach viertägigem Stehenlassen in Methanol ähnliche Effekte zu beobachten. Anscheinend läuft bei diesen Verbindungen die Konformationsumwandlung sehr langsam ab. Eine detaillierte Untersuchung dieses Prozesses, vor allem in verschiedenen Lösungsmitteln, wäre nötig, um nähere Hinweise zu erhalten.

3.5.3. Verbindungen des Typs mit x = 2, 3, 4, 5 Boc-Cys-[Gly]$_x$-Cys-OMe

Die CD-Spektren von Boc-L-cysteinyl-diglycyl- 2, Boc-L-cysteinyl-triglycyl- 3, Boc-L-cysteinyl-tetraglycyl- 4 und Boc-L-cysteinyl-pentaglycyl-cystein-disulfid-methylester 5 in Trifluoräthanol bei 20° C sind in Abb. 32 dargestellt; die Cotton-Effekt-Parameter sind in Tab. 13 zusammengefaßt.

All diesen Verbindungen ist gemeinsam, daß der kurzwellige Cotton-Effekt zwischen 220 nm und 207 nm im Gegensatz

Tab. 13: Lage und Elliptizitäten der Cotton-Effekte von 2 bis 5

Lösungsmittel	Temperatur	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	[θ]
		2		3		4		5	
Trifluoräthanol	20° C	301	110	275 –	395	272 –	760	272 –	775
		239 –	340	234	2905	238	840	241	1170
		216	11945			220	4375	209	21320
	45° C	298	150	277 –	350	274 –	570	274 –	515
		239 –	2770	240	1190	241	570	242	455
		213	11945	207	13265	216	4260	208	14600
Dioxan	20° C	310	70						
		262 –	1200						
		235 –	3840						
Äthanol (96 %)	20° C	305	95						
		285	135						
		238 –	3145						
		220	3520						

([θ] in grad cm^2 $dMol^{-1}$)

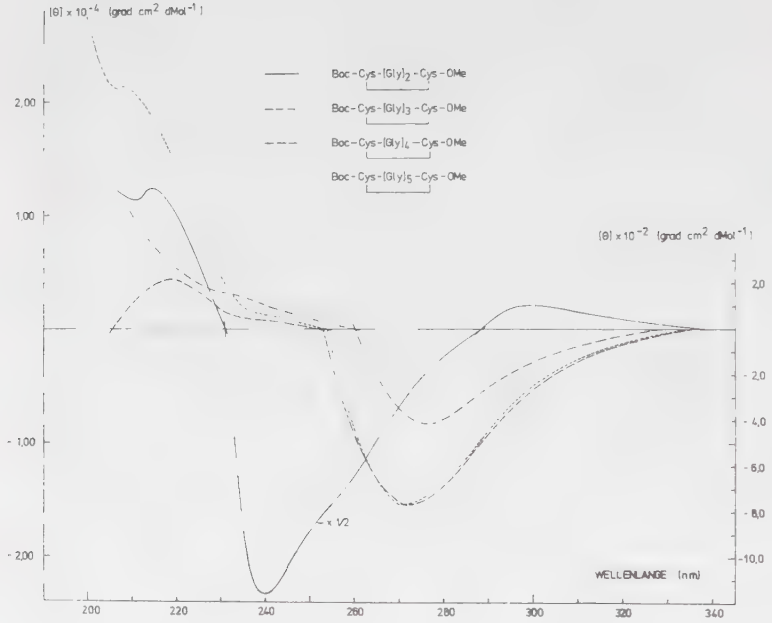


Abb. 32: CD-Spektren von 2, 3, 4 und 5 in Trifluor-äthanol

zu 1 positiv ist. Dieser Cotton-Effekt ist häufig sehr breit, sodaß die Annahme berechtigt scheint, daß in diesem Bereich zwei Cotton-Effekte auftreten. Dadurch könnte auch die starke Streuung der Cotton-Effekt-Maxima erklärt werden. Bedeutsam ist, daß auch bei L-Cystin im Gebiet um 220 nm ein positiver Cotton-Effekt der Carboxylgruppe auftritt. Die CD-Spektren der heterodetischen Peptide mit mehr als einem Glycylrest zwischen N- und C-terminalem L-Cystein werden also zunehmend dem von L-Cystin ähnlich. Dies zeigt sich besonders bei den Peptiden 3, 4 und 5, wo der längstwellige Cotton-Effekt um 300 nm nicht mehr auftritt. Der Disulfid-Cotton-Effekt besitzt hier eine negative Komponente bei etwa 275 nm bis 272 nm und eine positive bei etwa 235 nm bis 240 nm, die jedoch nur als Schulter des anschließenden positiven Cotton-Effekts zu sehen ist. Dieses Verhalten entspricht dem von L-Cystin in alkalischer Lösung [20].

Die CD-Spektren von 2 erinnern noch am ehesten an die von 1, jedoch ist in dem Vierzehn-Ring von 2 gegenüber dem Elf-Ring von 1 schon keine oder nur eine ganz geringe gegenseitige Beeinflussung der Disulfid- und Amidgruppen zu erkennen. Dieser Befund wird sowohl durch die kürzerwellige Lage des gestörten Carbonylübergangs als auch durch die starke Verringerung der Elliptizität dieses Cotton-Effekts gestützt. Ebenso liegen die Disulfid-Cotton-Effekte bei kürzeren Wellenlängen, was jedoch auch auf Unterschiede in den Torsionswinkeln von 1 und 2 zurückgeführt werden kann.

3.5.3. L-Cysteinyl-pentaglycyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid 5a und L-Cysteinyl-heptaglycyl-cystein-disulfid 6

Die CD-Spektren von L-Cysteinyl-pentaglycyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid 5a und von L-Cysteinyl-heptaglycyl-cystein-disulfid 6 in Trifluoräthanol bzw. 1 N HCl

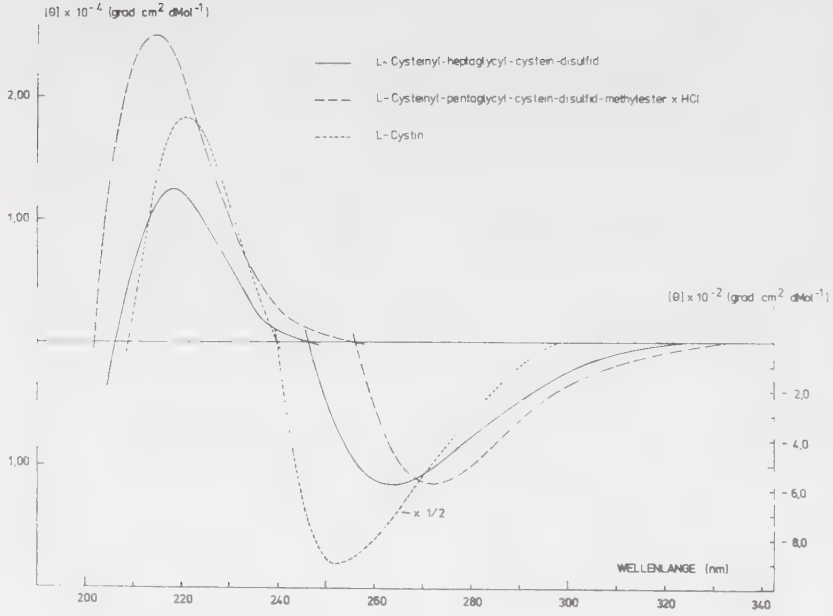


Abb. 33: CD-Spektren von L-Cysteinyl-heptaglycyl-cystein-disulfid und L-Cysteinyl-pentaglycyl-cystein-disulfid-methylester-hydrochlorid in Trifluoräthanol und von L-Cystin in 0,1 N HCl bei 20° C

bei 20° C sind zusammen mit dem CD-Spektrum von L-Cystin in 1 N HCl [20] in Abb. 33 dargestellt. Die Lage und molaren Elliptizitäten der Cotton-Effekte von 5a und 6 sind in Tab. 14 aufgeführt. Die Unterschiede von 5a und 6 zu L-Cystin sind nur noch gering; das Maximum des Disulfid-Cotton-Effekts liegt, wie bei anderen offenkettigen Cystinpeptiden längerwellig als in L-Cystin, seine Elliptizität beträgt in 5a und 6 etwa ein Drittel. Die Unterschiede im kurzwelligen Teil des Spektrums sind noch geringer. Der Trend von 3.5.2. wird also hier fortgesetzt, nach dem der Einbau weiterer Glycylreste zwischen N- und C-terminales L-Cystein die CD-Spektren dieser Verbindungen dem von L-Cystin immer ähnlicher werden läßt.

Tab. 14: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von 5a, 6 und L-Cystin bei 20° C

Verbindung	Lösungsmittel	λ(nm)	[θ] (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
5a	Trifluoräthanol	272	- 575
		215	25435
6	1 N HCl	265	- 575
		218	12305
	CF_3-CO-CF_3 x 3 H_2O	267	- 545
		218	13025
L-Cystin [20]	0,1 N HCl	252	- 1815
		220	18150

3.6. Vasotocine und Vasopressine

Das Vorkommen von relativ kleinen Ringen mit Disulfidbrücken mit ziemlich starrer Geometrie in der Natur ist seit langem bekannt. Ausführliche Untersuchungen des

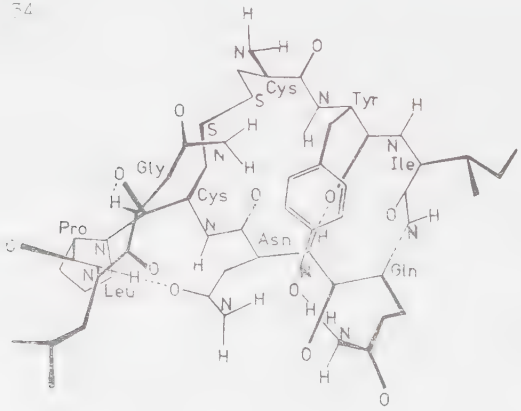
Circulardichroismus an Ringen mittlerer Größe wurden vor allem an den cyclischen Peptidhormonen Oxytocin und Vasopressin, sowie an zahlreichen Derivaten und Analogen dieser medizinisch wichtigen Hormone vorgenommen.

LYSINVASOTOCIN

3.6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Literatur

Die meisten Ergebnisse über die Konformation von Oxytocin, Vasopressin und ihren Analogen wurden aus ^{1}H-NMR- [10,11,120-126] und aus PFT-^{13}C-NMR-Untersuchungen [127,128] gewonnen. In DMSO-Lösungen dieser Hormone treten zwei Abschnitte mit β-Faltblattstruktur auf, die einerseits die Sequenz Tyr-Ile-Gln-Asn, andererseits Cys-Pro-Leu-Gly bei Oxytocin umfassen. Der aromatische Rest des Tyrosins befindet sich an der Peripherie des Moleküls, während er in der biologisch aktiven Konformation über die Zwanzig-Ringstruktur geklappt sein soll (Abb. 34) [129].

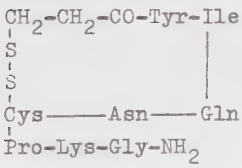
Abb. 34



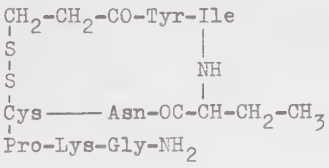
Bisherige CD-Daten legten nahe [130-134], daß in diesen Verbindungen die P-helikale Struktur der Disulfidbrücke vorherrscht, was im Widerspruch zu theoretischen Voraussagen [135] steht. Allerdings sollte beachtet werden, daß das Vorzeichen des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts im allgemeinen nicht zur Bestimmung der Helizität der CSSC-Gruppierung ausreicht.

3.6.2. CD-Spektren von Derivaten des Lysinvasotocins und Lysinvasopressins

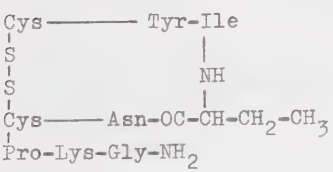
Die CD-Spektren von 1-Desamino-lysinvasotocin 1, von 1-Desamino,4-decarboxamido-lysinvasotocin 2, von 4-Decarboxamido-lysinvasotocin 3 und 1-Penicillamin-lysinvasopressin 4 in Trifluoräthanol bei 20° C sind in Abb. 35 dargestellt. Lysinvasotocin unterscheidet sich von Lysinvasopressin dadurch, daß in Position 3 statt eines Phenylalaninrests ein Isoleucinrest steht.



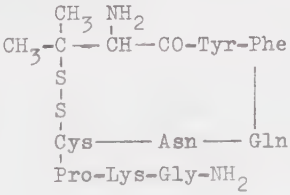
1



2



3



4

Bei den CD-Spektren von 1 treten im Bereich von 350 nm bis 200 nm drei Cotton-Effekte auf, ein schwacher negativer Cotton-Effekt als Schulter bei etwa 295 nm, ein

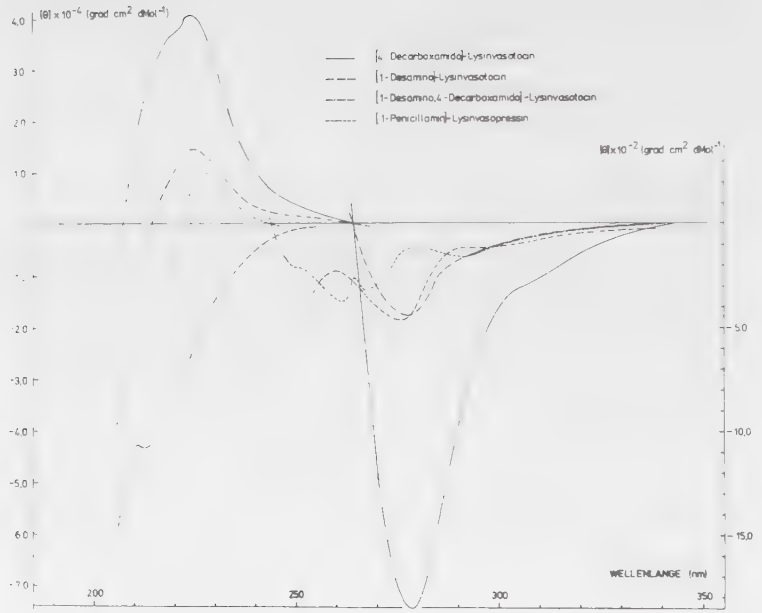


Abb. 35: CD-Spektren von 1, 2, 3 und 4 in Trifluoräthanol bei 20° C

etwas stärkerer negativer Cotton-Effekt bei 276 nm und ein sehr intensiver negativer Cotton-Effekt bei 213 nm (Tab. 15). Obwohl der Cotton-Effekt bei 276 nm sicher einen starken Anteil des B_{1u}-Übergangs [61] des Tyrosins besitzt, muß er doch auch einen Disulfidanteil enthalten. Das wird dadurch belegt, daß auch in Desamino-isoleucin^2-oxytocin, das keine Aromaten enthält, eine CD-Bande mit negativem Vorzeichen in diesem Bereich auftritt [130]. Erstaunlich ist, daß im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 260 nm kein Cotton-Effekt der Disulfidgruppe zu sehen ist; man könnte höchstens aus dem Verlauf des CD-Spektrums auf einen positiven Cotton-Effekt an der Stelle des relativen Maximums bei etwa 260 nm schließen. Aus dieser Lage des Cotton-Effekts folgt, daß der Torsionswinkel der CSSC-Gruppierung, wie in offenkettigen Disulfiden, etwa 90° betragen sollte. Der intensive negative Cotton-Effekt bei 213 nm ist auf eine Überlagerung von Beiträgen der Amid-, Tyrosin- und Disulfidübergänge zurückzuführen, wobei die Einzelbeiträge nur schwer ermittelt werden können. Das Fehlen eines langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts im CD-Spektrum von 1 stimmt mit Befunden an Desamino-oxytocin überein, wonach die fehlende α-Aminogruppe des Cysteins in Position 1 ein fast völliges Verschwinden der Disulfidbande hervorruft [130]. Ob dies auf einer Konformationsänderung gegenüber Oxytocin oder nur auf der verschiedenen Störung der Disulfidgruppe durch die Aminogruppe beruht, kann aus diesen Untersuchungen nicht entschieden werden.

Das Vasotocinanaloge 2 zeigt im langwelligen Bereich ein ausgeprägtes Minimum bei 277,5 nm, das dem bei 276 nm in 1 entspricht. Der Betrag der molaren Elliptizität dieses Cotton-Effekts ist allerdings fast doppelt so groß wie in 1 (Abb. 35 und Tab. 15). Hier tritt auch bei 250 nm der Cotton-Effekt des Disulfidchromophors deutlicher hervor, wenn er auch, wegen des sich anschließenden starken positiven Cotton-Effekts, nur als Schulter sichtbar ist.

Tab. 15: Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von Vasotocin- und Vasopressinderivaten bei 20° C in Trifluoräthanol

Verbindung	λ (nm)	$[\Theta]$ (grad cm^2 $dMol^{-1}$)
1	295	- 110
	276	- 480
	213	- 43700
2	277,5	- 890
	250	1600
	225	14500
3	305	- 320
	278	- 1880
	224	41100
	218	35200
4	290	- 155
	267	- 320
	261,5	- 370
	250	- 205
	228	9860
	217	- 10820

Die Tatsache, daß das Vorzeichen dieses Disulfid-Cotton-Effekts umgekehrt wie das in L-Cystin und seinen Derivaten ist, muß ähnlich wie bei den Tripeptiden mit Disulfidbrücken (3.4.) nicht unbedingt auf eine Umkehrung der Helizität gegenüber der in L-Cystin hinweisen; es ist durchaus möglich, daß auch in 2 starke intramolekulare Wechselwirkungen auftreten, z.B. zwischen Tyrosin oder Amidgruppen und der Disulfidgruppe. Das Vorzeichen des Disulfid-Cotton-Effekts würde dann nicht mehr von der Helizität bestimmt, sondern diese Störungen durch Nachbargruppen überlagern die inhärente Dissymmetrie der Disulfidgruppe. Das stark positive Maximum bei 225 nm kann, in Analogie zu vielen anderen Tyrosin enthaltenden Verbindungen, dem B_{1u}-Übergang des Aromaten zugeschrieben werden; zusätzlich enthält es Beiträge der n -π^*-Übergänge der Peptidchromophore. Der Grund für den starken Unterschied der CD-Spektren von 1 und 2 muß auf dem Fehlen der Carboxamidgruppe in 2 beruhen; tatsächlich gibt es Anzeichen dafür, daß diese Gruppe an konformationsstabilisierenden Wechselwirkungen durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe des Tyrosins und der primären Amidgruppe des Glutamins in Position 4 teilnimmt [136]. Diese Wechselwirkung (Abb. 34) ist in 2 nicht mehr möglich und wirkt sich entsprechend stark auf die Cotton-Effekte des L-Tyrosinrests aus. Die von anderer Seite vorgeschlagene Wechselwirkung des Tyrosinrests mit der Peptidbindung von L-Cystein in Position 1 [134] wird durch diese Befunde nicht widerlegt.

Das CD-Spektrum von 3 ist dem von Arginin-vasotocin in saurer Lösung sehr ähnlich [131]. Es ist daher vernünftig und zulässig, die für Arginin-vasotocin getroffenen Zuordnungen der Cotton-Effekte auf 3 anzuwenden, wenn auch in 3 wiederum die Carboxamidgruppe fehlt. Die Schulter bei 218 nm (Abb. 35 und Tab. 15) entspricht somit dem n -π^*-Übergang der Amidgruppen, während das Maximum bei 224 nm wieder dem B_{1u}-Übergang des Aromaten zugeordnet

werden kann. Die Disulfidgruppe ist nur als schwache Schulter bei etwa 250 nm sichtbar. Der stark negative Cotton-Effekt im langwelligen Bereich ist ebenfalls einem Übergang des L-Tyrosins zuzuordnen. Dieser Cotton-Effekt besitzt die doppelte Intensität verglichen mit dem von 2, verglichen mit dem von 1 sogar die vierfache. Gegenüber 2 ist auch der kurzwellige Cotton-Effekt des Tyrosinrests wesentlich verstärkt. Offensichtlich ist seine Elliptizität bei 225 nm, ebenso wie die im langwelligen Bereich, stark davon abhängig, ob sich in Position 1 am Cystein eine Aminogruppe befindet oder nicht. Eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Rest und der Aminogruppe an Cystein läßt sich jedoch ausschließen, da der pK-Wert dieser Aminogruppe ähnlich ist wie der von anderen Peptiden mit Cystein in Position 1 [130].

Bei 4 wird der langwellige Teil des CD-Spektrums durch die Schwingungsstruktur, die durch Phenylalanin hervorgerufen wird, dominiert. Die intensivste Komponente ist dabei die Bande bei 262 nm (Abb. 35 und Tab. 15). Wahrscheinlich sind aber auch noch Anteile des Disulfidübergangs in diesem Bandenzug enthalten. Der positive Cotton-Effekt bei 228 nm ist auf Übergänge der Aromaten zurückzuführen, während die negative Schulter bei 217 nm zu Übergängen der Amidgruppen gehört. Im Vergleich mit den früher hier diskutierten Peptiden liegen bei den Vasotocinen und bei diesem Vasopressinderivat die n $-\pi^*$-Übergänge der Amidgruppen bei sehr kurzen Wellenlängen.

In 1, 3 und 4 tritt zwischen 305 nm und 290 nm noch jeweils ein weiterer schwacher Cotton-Effekt auf, der in 1 und 3 nur als Schulter zu erkennen ist. Ohne weitere Untersuchungen kann man über den Ursprung dieses langwelligen Cotton-Effekts beim gegenwärtigen Erkenntnisstand nur spekulieren. Auch in der Literatur abgebildete CD-Spektren von Oxytocin, Vasopressin und ihren Derivaten zeigen häufig Schultern in diesem Bereich, auf deren Ursache jedoch nicht eingegangen wird.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe des Circulardichroismus, der ^{13}C-NMR-Spektroskopie, der IR- und der Raman-Spektroskopie wurden Derivate des L-Cystins sowie L-Cystin enthaltende kleinere offenkettige und cyclische Peptide untersucht. An den S-Alkylthio-L-cysteinen konnte gezeigt werden, daß der Einfluß von Alkylresten, die direkt an die Disulfidgruppe gebunden sind, auf den Circulardichroismus dieser Verbindungen nur gering ist. Er äußert sich nur in einer Wellenlängenverschiebung des Maximums des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad des an die Disulfidgruppe gebundenen Kohlenstoffatoms. Die CD-Spektren dieser Verbindungen legen nahe, daß Torsionswinkel und Helizität der Disulfidgruppe ähnlich sind wie in wäßrigen Lösungen von L-Cystin. Auch aus den Raman-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine im festen Zustand ergibt sich, daß eine weitgehende Ähnlichkeit dieser Verbindungen untereinander, unabhängig von der Art des Alkylrests, besteht.

Am Beispiel des oxidierten L-Glutathions (G-SS-G) wurde der Einfluß der Disulfidgruppe auf den Circulardichroismus offenkettiger Peptide untersucht. Aus den CD-Spektren ergibt sich, daß durch Wechselwirkungen zwischen der Disulfidgruppe und den Amidgruppen die Maxima der Cotton-Effekte beider Chromophore bathochrom verschoben werden. Die Einbeziehung der Aminogruppe des L-Cystins in eine Bindung äußert sich in einer Verminderung der negativen Elliptizität des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts. Die Temperaturabhängigkeit des Circulardichroismus von oxidiertem L-Glutathion kann durch eine Konformationsumwandlung durch Rotation um die Disulfidbrücke erklärt werden. CD-Spektren von G-SS-G in verschiedenen Lösungsmitteln zeigen, daß der langwellige Disulfid-Cotton-Effekt stark von der Polarität des Lösungsmittels abhängt. Gleichzeitig wird eine Änderung der Wechselwirkung zwi-

schen der Disulfidgruppe und den Amidgruppen beobachtet. ^{13}C-NMR-Untersuchungen an oxidiertem L-Glutathion weisen ebenfalls auf solche Wechselwirkungen hin. Die ausgeprägte Nichtlinearität der Temperaturabhängigkeit der ^{13}C-NMR-Signale des α- und β-Kohlenstoffatoms bestätigen die Konformationsumwandlung der Disulfidgruppe. Die Raman-Spektren im festen Zustand zeigen, daß der Torsionswinkel der Disulfidgruppe etwa 90° beträgt; auch in Lösung bleibt dieser Torsionswinkel erhalten.

An Cyclo-L-cystin wurde nachgewiesen, daß trotz des starren Diketopiperazinrings eine Konformationsumwandlung der Disulfidgruppe möglich ist. Mit Hilfe temperaturabhängiger ^{13}C-NMR-Messungen läßt sich die Barriere für diese Umwandlung zu etwa 16 kcal/Mol abschätzen. Aus den CD-Spektren kann nicht entschieden werden, welche Helizität der Disulfidbrücke in Cyclo-L-cystin bei Zimmertemperatur bevorzugt ist. In Übereinstimmung mit der Theorie der optischen Aktivität der Disulfidgruppe ist kein langwelliger Disulfid-Cotton-Effekt zu beobachten. Bei Wellenlängen um 300 nm tritt jedoch ein äußerst schwacher Cotton-Effekt auf, der bisher nicht entdeckt worden war. Dieser langwellige Cotton-Effekt erscheint auch bei L-Cysteinyl-cystein-disulfid und seinen Derivaten. Die IR-Spektren sowie die Raman-Spektren beweisen das Vorliegen von cis-Amidbindungen.

Die Wechselwirkung zwischen der Disulfidgruppe und den Amidbindungen in den heterodetischen cyclischen Tripeptiden ruft einen langwelligen Cotton-Effekt um 300 nm hervor, der eine starke Lösungsmittelabhängigkeit zeigt. Im Gegensatz zu dem langwelligen Disulfid-Cotton-Effekt und dem $n \rightarrow \pi^*$-Amid-Cotton-Effekt tritt beim Übergang von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln eine bathochrome Verschiebung dieses Cotton-Effekts auf. In der Reihe der durch die tert.-Butyloxycarbonylgruppe geschützten Tripeptide ist der Einfluß der optisch aktiven Aminosäu-

re in Position 2 auf den Circulardichroismus gering, bei den ungeschützten Tripeptiden wird er deutlicher. Die CD-Spektren dieser Verbindungen werden aber hauptsächlich von der Konformation der Disulfid-Ringstruktur bestimmt, die bei den geschützten wie bei den ungeschützten Tripeptiden im wesentlichen die gleiche ist. Aufgrund der Wechselwirkung der Disulfidgruppe mit anderen Chromophoren kann das Vorzeichen des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts nicht zur Bestimmung der Helizität der Disulfidgruppe herangezogen werden. Die IR-Spektren der geschützten Verbindungen legen nahe, daß im festen Zustand ausschließlich trans-Amidbindungen vorliegen, ein Befund, der aber nicht auf Lösungen übertragen werden darf.

Das heterodetische cyclische Tripeptid mit Disulfidbrücke mit Glycin in Position 2 wurde als Anfangsglied einer Reihe von Peptiden untersucht, die zwischen einem und sieben Glycinresten zwischen N- und C-terminalem L-Cystein enthalten. Die CD-Spektren der Verbindungen mit mehr als zwei Glycinresten sind denen von L-Cystin bzw. von methylierten L-Cystinen sehr ähnlich. In dem zwei Glycinreste enthaltenden Tetrapeptid scheint noch eine, wenn auch geringe Wechselwirkung zwischen der Disulfidgruppe und den Amidgruppen zu bestehen. Diese Wechselwirkung ist am stärksten bei dem nur einen Glycinrest enthaltenden Tripeptid. Der Vergleich mit den Tripeptiden mit optisch aktiver Aminosäure in Position 2 zeigt, daß diese einen negativen Beitrag zum Circulardichroismus des Cotton-Effekts bei 260 nm liefern. Von besonderer Bedeutung ist, daß beim Übergang vom Kristall in eine äthanolische Lösung das CD-Spektrum des Glycin enthaltenden Tripeptids eine ausgeprägte Zeitabhängigkeit zeigt. Durch eine spektroskopisch-kinetische Analyse läßt sich nachweisen, daß ein einheitlicher Prozess dafür verantwortlich ist, der in einer Konformationsumwandlung der gesamten Ringstruktur besteht.

In Peptiden, die gleichzeitig Disulfidbrücken und aromatische Aminosäurereste enthalten, werden die CD-Spektren vom Circulardichroismus der Aromatenübergänge dominiert. Dennoch ist in den Vasotocin- und Vasopressinderivaten, die hier untersucht wurden, der Einfluß der Disulfidgruppe auf den Circulardichroismus zu erkennen. Aus den nur schwach und häufig als Schultern auftretenden langwelligen Disulfid-Cotton-Effekten sollte jedoch keine Zuordnung der Helizität der CSSC-Gruppierung in diesen Verbindungen getroffen werden.

5. ANHANG

5.1. Durchführung der Messungen

UV- und CD-Spektren:
Zur Aufnahme der UV-Spektren wurden Lösungen von ca. 1,5 mg/10 ml, zur Aufnahme der CD-Spektren Lösungen von zwischen 20 mg/10 ml und 3 mg/10 ml hergestellt. Die UV-Spektren wurden mit dem UV-Spektrometer Cary 15 (Firma Varian, Darmstadt) bei Raumtemperatur in Küvetten mit Schichtdicken zwischen 1,0 cm und 0,1 cm aufgenommen. Die CD-Spektren wurden mit dem Dichrograph II (Firma Roussel-Jouan, Paris) in Küvetten mit Schichtdicken zwischen 2,00 cm und 0,01 cm gemessen. Jede Messung wurde mindestens einmal wiederholt. Die CD-Messungen wurden mit einer Lösung von Epiandrosteron in Dioxan überprüft, wobei eine molare Elliptizität von 10925 grad cm^2 $dMol^{-1}$ bei 304 nm als Standard angenommen wurde. Die ermittelten molaren Elliptizitäten erwiesen sich im Bereich 10^{-3} molarer Lösungen als konzentrationsunabhängig.

Die Messung der Temperaturabhängigkeit im Bereich von 5° C bis 95° C erfolgte unter Thermostatisierung ($\pm$ $0,5^{\circ}$ C) des Küvettenraums mit einem Thermostat FK 2 (Firma Haake, Karlsruhe). Um jeweils konstante Temperaturen der Lösung zu gewährleisten, wurden die Lösungen mindestens 15 Minuten vor der Messung, bei Temperaturen oberhalb von 50° C mindestens 25 Minuten, im Küvettenraum thermostatisiert. Die pH-Werte wurden mit 2 N NaOH und 2 N HCl p.a. mit Hilfe eines Precision Potentiometers E 353 B (Firma Metrohm, Herisau, Schweiz) mit einer Kalomel-Mikrostabelektrode pH 0-12 (Firma Ingold, Frankfurt) unter Verwendung von Eichpuffern vergleichbarer Ionenstärke eingestellt.

^{13}C-NMR-Spektren:
Zur Messung der ^{13}C-NMR-Spektren wurden Lösungen von mindestens 100 mg/ml verwendet. Die Impuls-Fourier-Transform-

^{13}C-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker-HFX-90 NMR-Spektrometer (22,63 MHz) unter Protonen-Breitband-Entkopplung aufgenommen. Je nach Konzentration der Lösung wurden 1048 bis 16000 Impulsinterferogramme mit einem Fabritek 1074-Rechner (4K) akkumuliert. Die Pulsbreite betrug 4-6 sec, das Impulsintervall 0,4 sec. Von den akkumulierten Impulsinterferogrammen wurden mit Hilfe des PDP-8-I-Rechners (8K) durch Fourier-Transformation die ^{13}C-NMR-magnitude Spektren erhalten. Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen δ(ppm) der Signale sind auf Tetramethylsilan (δ = 0 ppm) bezogen.

IR- und Laser-Raman-Spektren:
Die IR-Spektren wurden von den festen Verbindungen in KBr aufgenommen. Zur Messung der Spektren wurde das Beckmann IR 12 Infrared Spectrometer verwendet. Die Raman-Spektren der Festkörper wurden in Schmelzpunktskapillaren aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren in Lösung erfolgte in Küvetten mit einer Schichtdicke von ca. 3 cm. Zur Registrierung der Raman-Spektren wurde das Laser-Raman-Spektrometer JEOL JRS-1 (Firma Kontron, München) verwendet. Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Laser der Firma Spectra Physics, Darmstadt mit Wellenlängen bei 4880 A und 5145 A. Die gemessenen Raman-Spektren waren von der Anregungswellenlänge unabhängig. Die Laser-Ausgangsleistung betrug zwischen 0,1 Watt und 0,8 Watt.

5.2. Verbindungen

Die S-Alkylthio-L-cysteine, Cyclo-L-cystin und seine Derivate, die heterodetischen Tripeptide sowie die Verbindungen aus Abschnitt 3.5., ausgenommen L-Cysteinyl-heptaglycyl-cystein-disulfid, wurden von Herrn Dr. P. Hartter synthetisiert. Die analytischen Daten dieser Verbindungen sind in [137-142] aufgeführt. Die Lysinvasotocine, 1-Penicillamin-lysinvasopressin und L-Cysteinyl-heptaglycyl-cystein-disulfid wurden von Herrn Prof. Dr. M. Rimp-

ler zur Verfügung gestellt. Reduziertes und oxidiertes L-Glutathion wurde von der Firma Serva, Heidelberg bezogen. Die Lösungsmittel für die Messung der UV- und CD-Spektren wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet (Uvasol-Lösungsmittel). Äthanol wurde über Natriumsuspension absolutiert und nochmals destilliert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1) N. Isenberg und M. Grdinic,
J. Chem. Ed. 49 (1972), 392

2) S. Colowick, A. Lazarov, E. Racker, D.R. Schwarz,
E.Stadman und H. Waelsch (Herausg.),
"Glutathione", Academic Press, New York (1954)

3) L.Flohé, H.Ch. Benöhr, H. Sies, H.D. Waller und
A.Wendel (Herausg.),
"Glutathione", G. Thieme Publ., Stuttgart (1974)

4) M.R. Bell, J.R. Johnson, B.S. Wildl und R.B. Woodward,
J. Am. Chem. Soc. 80 (1958), 1001

5) R. Nagarajan, L.L. Huckstep, D.H. Lively, D.C. De Long
M.M. Marsh und N. Neuss,
J. Am. Chem. Soc. 90 (1968), 2980

6) P.A. Miller, P.W. Trown, W. Fulmor, G.O. Morton und
J. Karliner,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968), 219

7) R. Hodges, J.W. Ronaldson, A. Taylor und E.P. White,
Chem. Ind. (London) (1963), 42

8) J. Fridrichsons und A. McL. Mathieson,
Acta Crystallogr. 18 (1965), 1043

9) D. Hauser, H.P. Weber und H.P. Sigg,
Helv. Chim. Acta 53 (1970), 1061

10) R. Walter
Excerpta Medica 241 (1971), 181

11) P.H. von Dreele, A.I. Brewster, J. Dadok, H.A. Scheraga,
F.A. Bovey, M.F. Ferger und V. du Vigneaud,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69 (1972), 2169

12) M. Grosjean und M. Tari,
Compt. Rend. 258 (1964), 2043

13) S. Beychok,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 53 (1965), 999

14) C.C. Blake, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips
und V.R. Sarma,
Proc. R. Soc. London, Ser. B 167 (1967), 365

15) M. Legrand und R. Viennet,
Compt. Rend. 259 (1964), 4227

16) M. Carmack und L.A. Neubert,
J. Am. Chem. Soc. 89 (1967), 7134

17) R.M. Dodson und V.C. Nelson,
J. Org. Chem. 33 (1968), 3966

18) G. Claeson,
Acta Chem. Scand. 22 (1968), 2429

19) L.A. Neubert und M. Carmack,
J. Am. Chem. Soc. 96 (1974), 943

20) J.P. Casey und R.B. Martin,
J. Am. Chem. Soc. 94 (1972), 6141

21) U. Ludescher und R. Schwyzer,
Helv. Chim. Acta 54 (1971), 1637

22) B. Donzel, B. Kamber, K. Wüthrich und R. Schwyzer,
Helv. Chim. Acta 55 (1972), 947

23) S. Kukolja, P.V. Demarco, N.D. Jones, M.O. Chaney
und J.W. Paschal,
J. Am. Chem. Soc. 94 (1972), 7592

24) A.F. Beecham und A.McL. Mathieson,
Tetrahedron Lett. (1966), 3139

25) A.F. Beecham, J.W. Loder und G.B. Russell,
Tetrahedron Lett. (1968), 1785

26) A.F. Beecham, J. Fridrichsons und A.McL. Mathieson,
Tetrahedron Lett. (1966), 3131

27) R. Nagarajan, N. Neuss und M.M. Marsh,
J. Am. Chem. Soc. 90 (1968), 6518

28) M. Legrand und R. Viennet,
Bull. Soc. Chim. France (1965), 679

29) L. Fowden, P.M. Scopes und R.N. Thomas,
J. Chem. Soc. C (1971), 833

30) T. Takagi und N. Ito,
Biochim. Biophys. Acta 257 (1972), 1

31) M. Ottnad, Diplomarbeit, Tübingen 1972

32) D.L. Coleman und E.R. Blout,
J. Am. Chem. Soc. 90 (1968), 2405

33) T. Takagi, R. Okano und T. Miyazawa,
Biochim. Biophys. Acta 310 (1973), 11

34) N. Ito und T. Takagi,
Biochim. Biophys. Acta 221 (1970), 430

35) P.C. Kahn und S. Beychok,
J. Am. Chem. Soc. 90 (1968), 4168

36) M. Ottnad, C. Ottnad, P. Hartter und G. Jung
Tetrahedron, im Druck

37) M. Ottnad, C. Ottnad, P. Hartter und G. Jung,
siehe 3), dort S. 20

38) R.S. Cahn, C. Ingold und V. Prelog,
Angew. Chem. 78 (1966), 413

39) C. Ottnad, Zulassungsarbeit, Tübingen 1972

40) R.R. Fraser, G. Boussard, J.K. Saunders, J.B. Lambert und C.E. Mixan,
J. Am. Chem. Soc. 93 (1971), 3822

41) D.W. Scott, H.L. Finke, M.E. Gross, G.B. Guthrie und H.M. Huffman,
J. Am. Chem. Soc. 72 (1950), 2424

42) D.W. Scott, H.L. Finke, J.P. McCullough, M.E. Gross, R.E. Pennington und G. Waddington,
J. Am. Chem. Soc. 74 (1952), 2478

43) G.A. Crowder und D.W. Scott,
J. Mol. Spectr. 16 (1965), 122

44) G. Toennies und T.F. Lavine,
J. Biol. Chem. 89 (1930), 153

45) G. Bergson,
Ark. Kemi 18 (1962), 409

46) G. Bergson,
Ark. Kemi 12 (1958), 233

47) D.B. Boyd,
J. A. Chem. Soc. 94 (1972), 8799

48) L. Pauling,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 35 (1949), 495

49) G. Wagner und H. Bock,
Chem. Ber. 107 (1974), 68

50) H. Bock und G. Wagner,
Angew. Chem. 84 (1972), 119

51) J.A. Barltrop, P.M. Hayes und M. Calvin,
J. Am. Chem. Soc. 76 (1954), 4348

52) J. Webb, R.W. Strickland und F.S. Richardson,
J. Am. Chem. Soc. 95 (1973), 4775

53) S.D. Thompson, D.G. Carroll, F. Watson, M. O'Donnell und S.P. McGlynn,
J. Chem. Phys. 45 (1966), 1367

54) R.W. Woody,
Tetrahedron 29 (1973), 1273

55) H. Yamabe, H. Kato und T. Yonezawa,
Bull. Chem. Soc. Japan 44 (1971), 22

56) H. Yamabe, H. Kato und T. Yonezawa,
Bull. Chem. Soc. Japan 44 (1971), 604

57) G. Wagnière und W. Hug
Tetrahedron Lett. (1970), 4765

58) J. Linderberg und J. Michl,
J. Am. Chem. Soc. 92 (1970), 2619

59) A.N. Glazer und K. Rosenheck,
J. Biol. Chem. 237 (1962), 3647

60) E.E. Barnes und W.T. Simpson,
J. Chem. Phys. 39 (1963), 670

61) J.N. Murrell,
Elektronenspektren organischer Moleküle, Bibliographisches Institut, Mannheim (1967), dort S. 200

62) M. Legrand und R. Viennet,
Compt. Rend. 262 (1966), 943

63) L.I. Katzin und E. Gulyas,
J. Am. Chem. Soc. 90 (1968), 247

64) G. Jung, M. Ottnad und M. Rimpler,
Eur. J. Biochem. 35 (1973), 436

65) D.W. Urry, D. Miles, D.J. Caldwell und H. Eyring,
J. Phys. Chem. 69 (1965), 1603

66) E.C. Jorgensen,
Tetrahedron Lett. (1971), 863

67) W. Moffitt, R.B. Woodward, A. Moscowitz, W. Klyne und C. Djerassi,
J. Am. Chem. Soc. 83 (1961), 4013

68) A. Hordvik,
Acta Chem. Scand. 20 (1966), 1885

69) N.B. Colthup, L.H. Daly und S.E. Wiberley,
"Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy",
Academic Press, New York (1964)

70) G. Jung und M. Ottnad,
Chemiker-Ztg. 98 (1974), 147

71) H. Sugeta, A. Go und T. Miyazawa,
Bull. Chem. Soc. Japan 46 (1973), 3407

72) B. Schrader,
Angew. Chem. 85 (1973), 925

73) J.T. Edsall, J.W. Otvos und A. Rich,
J. Am. Chem. Soc. 72 (1950), 474

74) D. Garfinkel und J.T. Edsall,
J. Am. Chem. Soc. 80 (1958), 3823

75) H. Brunner und H. Sussner,
Biochim. Biophys. Acta 271 (1972), 280

76) R.C. Lord und N.T. Yu,
J. Mol. Biol. 50 (1970), 509

77) N.T. Yu und B.H. Jo,
Arch. Biochem. Biophys. 156 (1973), 469

78) N.T. Yu, B.H. Jo und C.S. Liu,
J. Am. Chem. Soc. 94 (1972), 7572

79) N.T. Yu und C.S. Liu,
J. Am. Chem. Soc. 94 (1972), 3250

80) N.T. Yu, C.S. Liu, J. Culver und D.C. O'Shea,
Biochim. Biophys. Acta 263 (1972), 1

81) N.T. Yu, C.S. Liu und D.C. O'Shea,
J. Mol. Biol. 70 (1972),117

82) H.E. van Wart, A. Lewis, H.A. Scheraga und F.D. Saeva,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 70 (1973), 2619

83) E.J. Bastian und R.B. Martin,
J. Phys. Chem. 77 (1973), 1129

84) G. Bergson, G. Claeson und L. Schotte,
Acta Chem. Scand. 16 (1962), 1159

85) N.A. Rosenthal und G. Oster,
J. Am. Chem. Soc. 83 (1961), 4445

86) E. Campaigne, J. Tsurugi und W.W. Meyer,
J. Org. Chem. 26 (1961), 2486

87) S. Jung, M. Ottnad, W. Voelter und E. Breitmaier,
Z. Anal. Chem. 261 (1972), 328

88) E.B. Nielsen und J.A. Schellman,
Biopolymers 10 (1971), 1559

89) W. Kauzmann und H. Eyring,
J. Chem. Phys. 9 (1941), 41

90) R.B. Martin und R. Mathur,
J. Am. Chem. Soc. 87 (1965), 1065

91) A.S. Manocha, W.G. Fateley und T. Shimanouchi,
J. Phys. Chem. 77 (1973), 1977

92) S. Weiss und G.E. Leroi,
J. Chem. Phys. 48 (1968), 962

93) N. Solimene und B.P. Dayley,
J. Chem. Phys. 23 (1955), 124

94) B. Kirtman,
J. Chem. Phys. 37 (1962), 2516

95) G. Jung, E. Breitmaier, W.A. Günzler, M. Ottnad,
W. Voelter und L. Flohé, siehe 3), dort S. 1

96) G. Jung, E. Breitmaier und W. Voelter,
Eur. J. Biochem. 24 (1972), 438

97) J. Peterson, L.K. Steinrauf und L.H. Jensen,
Acta Crystallogr. 13 (1960), 104

98) G. Jung, M. Ottnad und E. Breitmaier
in Vorbereitung

99) J.G. Kirkwood,
J. Chem. Phys. 5 (1937), 479

100) R. Nagarajan und R.W. Woody,
J. Am. Chem. Soc. 95 (1973), 7212

101) S. Berger, Dissertation, Tübingen 1973

102) D.K. Dalling, D.M. Grant und L.F. Johnson,
J. Am. Chem. Soc, 93 (1971), 3678

103) O.A. Gansow, J. Killough und A.R. Burke,
J. Am. Chem. Soc. 93 (1971), 4297

104) H. Kessler und W. Rundel,
Chem. Ber. 101 (1968), 3350

105) A.J. Hopfinger,
"Conformational Properties of Macromolecules", Academic Press, New York (1973), S. 137

106) R. Chandrasekaran und R. Balasubramanian,
Biochim. Biophys. Acta 188 (1969), 1

107) K. Blaha, J. Smolikova und A. Vitek,
Coll. Czech. Chem. Commun. 31 (1966), 4286

108) M.Ptak in
"Conformation of Biological Molecules and Polymers"
(E.D. Bergmann und B. Pullman, Herausg.), Academic
Press, New York (1973), S. 203

109) R. Gallardo-Herrero, G. Torri, J.F. Gal und M. Azzaro,
Bull. Soc. Chim. France (1973), 881

110) G. Jung, N. Dubischar, D. Leibfritz, M. Ottnad, H.
Probst und C. Stumpf in
"Peptides 1974", im Druck

111) M. Tichy, E. Duskova und K. Blaha,
Tetrahedron Lett. (1974), 237

112) D. Balasubramanian und D.B. Wetlaufer in
"Conformation of Biopolymers", Vol. I (G.N. Ramachandran, Herausg.), Academic Press, London (1967), S. 147

113) G. Holzwarth und P. Doty,
J. Am. Chem. Soc. 87 (1965), 218

114) K. Titlestad, P. Groth und J. Dale,
J. C. S. Chem. Comm. (1973), 646

115) K.M. Wellman, P.H.A. Laur, W.S. Briggs, A. Moscowitz
und C. Djerassi,
J. Am. Chem. Soc. 87 (1965), 66

116) H. Lachmann, Dissertation, Tübingen 1973

117) H. Mauser,
Z. Naturforsch. 23b (1968), 1021

118) H. Mauser,
Z. Naturforsch. 23b (1968), 1025

119) H. Lachmann, H. Mauser, Fr. Schneider und H. Wenck,
Z. Naturforsch. 26b (1971), 629

120) R. Walter, J.D. Glickson, I.L. Schwartz, R.T. Havran,
J. Meienhofer und D.W. Urry,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69 (1972), 1920

121) J.D. Glickson, D.W. Urry und R. Walter,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69 (1972), 2566

122) P.H. von Dreele, A.I. Brewster, F.A. Bovey, H.A.
Scheraga, M. F. Ferger und V. du Vigneaud,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 68 (1971), 3088

123) J.D. Glickson, D.W. Urry, R.T. Havran und R. Walter
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69 (1972), 2136

124) P.H. von Treele, H.A. Scheraga, D.F. Dyckes, M.F. Ferger und V. du Vigneaud,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69 (1972), 3322

125) R. Walter und J.D. Glickson,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 70 (1973), 1199

126) A.I. Brewster, J.A. Glasel und V.J. Hruby,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69 (1972), 1470

127) R. Walter, K. und M. Prasad, R. Deslauriers und I.C.P. Smith,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 70 (1973), 2086

128) A.I.R. Brewster, V.J. Hruby, A.F. Spatola und F.A. Bovey,
Biochemistry 12 (1973), 1643

129) R. Walter in
Peptides 1972 (H. Hanson und H.D. Jakubke, Herausg.)
North-Holland Publ. Comp., Amsterdam (1973), S. 324

130) S. Beychok und E. Breslow,
J. Biol. Chem. 243 (1968), 151

131) D.L. Coleman und E.R. Blout in
"Conformation of Biopolymers", Vol. I (G.N. Ramachandran, Herausg.), Academic Press, London (1967), S. 123

132) D.W. Urry, F. Quadrifoglio, R. Walter und I.L. Schwartz,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 60 (1968), 967

133) R. Walter, W. Gordon, I.L. Schwartz, F. Quadrifoglio und D.W. Urry in
"Peptides 1968" (E. Bricas, Herausg.), North-Holland Publ. Comp., Amsterdam (1968), S. 50

134) I. Fric, M. Kodicek, K. Jost und K. Blaha in
"Peptides 1972" (H. Hanson und H.D. Jakubke, Herausg.),
North-Holland Publ. Comp., Amsterdam (1973), S. 318

135) K.D. Gibson und H.A. Scheraga,
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 58 (1967), 1317

136) Y.A. Ovchinikov in
"Peptides 1972" (H. Hanson und H.D. Jakubke, Herausg.),
North-Holland Publ. Comp., Amsterdam (1973), S. 27

137) P. Hartter, Dissertation, Tübingen 1973

138) U. Weber und P. Hartter,
Z. Physiol. Chem. 351 (1970), 1384

139) U. Weber, P. Hartter und L. Flohé,
Z. Physiol. Chem. 351 (1970), 1389

140) P. Hartter und U. Weber,
Z. Physiol. Chem. 354 (1973), 365

141) U. Weber und P. Hartter,
Z. Physiol. Chem. 355 (1974), 189

142) U. Weber und P. Hartter,
Z. Physiol. Chem. 355 (1974), 200

Herrn Prof. Dr. Manfred Rimpler, Institut für klinische Biochemie und Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule, Hannover danke ich sehr herzlich für die Überlassung der Vasotocin- und Vasopressinderivate und für das cyclische Nonapeptid.

Herrn Dr. Klaus-Peter Hartter, Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Tübingen danke ich sehr herzlich für die Überlassung der S-Alkylthio-L-cysteine, von Cyclo-L-cystin und seinen Derivaten, der cyclischen Tripeptide sowie der cyclischen Oligopeptide.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Breitmaier danke ich für die Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren und für viele Anregungen.

Lebenslauf

Am 24. Februar 1949 wurde ich als Sohn des Betriebswirts Herbert Ottnad und seiner Ehefrau Charlotte Ottnad, geb. Reck, in Rottweil geboren.
Von April 1955 bis März 1959 besuchte ich die Volksschule in Rottweil. Danach trat ich im April 1959 in das Albertus-Magnus-Gymnasium in Rottweil ein. Nach einem einjährigen Studienaufenthalt in den Vereinigten Staaten von Juli 1965 bis Juli 1966, wo ich im Juni 1966 das High School Diploma erhielt, legte ich im Juni 1967 am Gymnasium in Rottweil die Reifeprüfung ab.
Seit dem WS 1967/68 studiere ich an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, wo ich am 23. Oktober 1969 die Vordiplomprüfung in Chemie abschloss. Den mündlichen Teil der Diplomprüfung bestand ich im Juli 1971 und beendete die Diplomarbeit im Februar 1972.
Am 14. Oktober 1972 heiratete ich die Studentin der Biologie und Chemie Christa-Maria Böddicker.
Unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Jung führte ich die vorliegende Arbeit in der Zeit vom April 1972 bis Mai 1974 im Chemischen Institut der Universität Tübingen durch.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich
D. Babel, E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, W. Hewers, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. König, G. Kortüm, W. Kraus, H. Krüger, H. Mauser, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Opitz, H. Rau, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Schweizer, F.F. Seelig, [illegible] Stumpp und W. Voelter

B. Ladewig-Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3 12 88 85 - 3 13 81 98